

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Ingeniería Química



TESIS DOCTORAL

Producción de DHA a partir de glicerol con *Gluconobacter oxydans*: desarrollo del bioproceso

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Susana de la Morena López

Directores

Félix García-Ochoa Soria
Victoria E. Santos Mazorra

Madrid, 2018

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

DEPARTAMENTO INGENIERÍA QUÍMICA



TESIS DOCTORAL

**Producción de DHA a partir de glicerol con
Gluconobacter oxydans: desarrollo del bioproceso**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN EL PROGRAMA DE
DOCTORADO EN INGENIERÍA QUÍMICA

PRESENTADA POR:

Susana de la Morena López

BAJO LA DIRECCIÓN DE LOS DOCTORES:

Félix García-Ochoa Soria

Victoria E. Santos Mazorra

Madrid, 2017

A mi familia

A Dani

La Dra. Victoria E. Santos Mazorra y el Dr. Félix García-Ochoa Soria, Profesores Titulares del Departamento de Ingeniería Química de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid, afirman haber dirigido el trabajo recogido en la presente Memoria en el citado departamento, y que, a su juicio, reúne los requisitos de originalidad y rigor científico necesarios para ser presentada como Tesis Doctoral.

Los Directores,

Dra. Victoria E. Santos Mazorra

Dr. Félix García-Ochoa Soria

Agradecimientos

A través de estas líneas me gustaría expresar mi gratitud a todas aquellas personas que me han acompañado durante estos más de 5 años en la aventura de la Tesis Doctoral, un camino tortuoso, nada fácil y lleno de obstáculos; pero a la vez, hermoso, lleno de aprendizaje y de crecimiento personal, que me ha enseñado que con fuerza de voluntad y perseverancia ninguna meta es inalcanzable.

En primer lugar, me gustaría agradecer a mis directores de Tesis, Victoria Santos y Félix García-Ochoa, la oportunidad brindada para adentrarme en el maravilloso mundo de la investigación con microorganismos. También me gustaría agradecer su labor de dirección, su paciencia y sus aportaciones para arrojar un poco de luz en los momentos difíciles. Asimismo, extendiendo este agradecimiento al Dr. Emilio Gómez por su contribución a hacer más comprensibles los aspectos relacionados con el oxígeno. No se me olvidan los debates con el profesor Dr. Miguel Ladero porque además de aclarar cualquier inquietud científica, de ellos han surgido buenas ideas para resolver problemas acontecidos durante el desarrollo de esta Tesis Doctoral. A todos ellos les doy las gracias por transmitirme un poquito de su sabiduría tanto personal, como profesional.

Sin duda, este logro no hubiera sido posible sin la complicidad e inestimable ayuda de mis compañeros de laboratorio. Gracias al Dr. Igor Martínez y al Dr. Sebastián Escobar por sus consejos, sus enseñanzas y sus recomendaciones. Y qué decir de Mateusz Wojtusik, fuente de conocimiento y sabiduría, siempre dispuesto a ayudar y a ofrecer sus conocimientos informáticos para que el funcionamiento de los equipos del laboratorio sea el correcto. Gracias a la Dra. Vanessa Ripoll y Alberto Rodríguez por las largas intervenciones en el laboratorio que siempre aportaban clarividencia, en ellas hemos podido compartir las alegrías y sinsabores de la vida. Gracias a Miguel García, mi alumno estrella, porque de él he aprendido un poquito de la bioquímica necesaria para comprender el metabolismo bacteriano. También quiero agradecer a Isabel de la Torre y Alberto Ramón su aporte de frescura y alegría al laboratorio. El apoyo de todos ellos ha sido fundamental, indudablemente el camino habría sido más inhóspito sin su ayuda. Con ellos he compartido interminables horas

de laboratorio e innumerables experiencias y de ellos me llevo una amistad que seguro perdurará en el tiempo.

También quiero expresar mi gratitud a todos los compañeros del departamento de Ingeniería Química por amenizar esta carrera de fondo en las "reuniones" organizadas en la Planta Piloto. Aquí incluyo al grupo de compañeras con las que comencé mis andaduras en la carrera de Ingeniería Química, porque 12 años después se han convertido en verdaderas amigas.

Asimismo, quiero dar las gracias a mis amigos de toda la vida: Vanessa, Ana Belén, Daniel y Silvia porque, aunque no hayamos podido compartir mucho tiempo juntos en esta última etapa de la Tesis Doctoral, siempre han sido un pilar fundamental en mi vida, forman parte de mi familia.

No me olvido del apoyo incondicional de mis padres y mi hermana porque siempre han creído en mí, a ellos les debo este logro. Pero también, quiero agradecer a Dani, mi compañero de viajes, su alegría y optimismo porque siempre ha sabido cómo hacerme sonreír en los momentos más duros. Nos esperan nuevas aventuras que compartir juntos y un futuro esperanzador.

Además, me gustaría hacer una mención especial al Prof. Dr. Klaus-Dieter Vorlop por acogerme durante 4 meses en el Centro de Investigación Thünen Institute en Braunschweig (Alemania) porque durante esta etapa pude descubrir los secretos de la inmovilización de microorganismos en LentiKats y desarrollarme un poco más en lo personal. Vielen Dank!

Igualmente, quiero agradecer el apoyo del Ministerio de Ciencia e Innovación por la financiación a través del proyecto CTQ 2010-15460 y la beca FPI BES-2011-044438.

Por último, y no por ello menos importante, gracias a los millones de bacterias que han hecho posible este estudio. Ellas son las protagonistas de este trabajo de investigación.

"No te rindas, aún estás a tiempo
de alcanzar y comenzar de nuevo,
aceptar tus sombras,
enterrar tus miedos,
liberar el lastre,
retomar el vuelo.

No te rindas que la vida es eso,
continuar el viaje,
perseguir tus sueños,
destrabar el tiempo,
correr los escombros,
y destapar el cielo"

Mario Benedetti

"Ciencia es todo aquello sobre lo cual
siempre cabe discusión"

José Ortega y Gasset

ÍNDICE

SUMMARY	1
CAPÍTULO 1.	9
1.1 AUGE DEL MERCADO DEL BIODIÉSEL.....	13
1.2 PROCESO DE PRODUCCIÓN DE BIODIÉSEL.....	15
1.3 PROBLEMÁTICA DEL GLICEROL.....	19
1.4 REVALORIZACIÓN DEL GLICEROL	21
1.4.1 Oxidación parcial	22
1.4.2 Hidrogenolisis	24
1.4.3 Deshidratación selectiva	24
1.4.4 Esterificación y transesterificación.....	25
1.4.5 Esterificación y polimerización.....	25
1.4.6 Carboxilación.....	26
1.4.7 Gasificación.....	26
1.4.8 Biocatálisis	27
1.5 DIHIDROXIACETONA.....	30
1.5.1 Aplicaciones	30
1.5.2 Obtención: vía química vs vía biotecnológica	34
1.6 ETAPAS CLÁSICAS DEL DESARROLLO DE BIOPROCESOS.....	40
1.7 OBJETO Y ALCANCE DEL TRABAJO.....	42
1.8 BIBLIOGRAFÍA	44
CAPÍTULO 2.	57
2.1 MATERIALES EMPLEADOS.....	61
2.1.1 Microorganismo	61
2.1.2 Reactivos.....	63
2.1.3 Medios de cultivo	65
2.2 EQUIPOS.....	67
2.2.1 Equipos para trabajar en condiciones de esterilidad	67
2.2.2 Equipos para la conservación y el cultivo de células.....	67
2.2.3 Equipos de medida y análisis	72
2.2.4 Equipos auxiliares	75

2.3	PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES	77
2.3.1	Protocolo de esterilización y manipulación	77
2.3.2	Protocolo de conservación del microorganismo	78
2.3.3	Preparación del inóculo	78
2.3.4	Experimentos de producción de DHA	79
2.3.5	Medida de la actividad enzimática	81
2.3.6	Conteo de células viables en placa	82
2.3.7	Inmovilización del microorganismo	83
2.4	MÉTODOS DE ANÁLISIS	84
2.4.1	Análisis de la biomasa	84
2.4.2	Análisis del sustrato y de los productos	86
2.5	MÉTODOS DE ESTIMACIÓN Y DE AJUSTE	91
2.5.1	Estimación de k_La	91
2.5.2	Determinación experimental de OTR, k_La , OUR y q_{O_2}	95
2.5.3	Modelización cinética del proceso y método de ajuste	97
2.6	BIBLIOGRAFÍA	100
	CAPÍTULO 3.	105
3.1	ANTECEDENTES	109
3.2	ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN DEL MEDIO	114
3.2.1	Resultados experimentales	115
3.2.2	Discusión de los resultados	119
3.2.3	Ensayo de actividad enzimática	124
3.3	ESTUDIO DE LA INHIBICIÓN POR SUSTRATO	129
3.3.1	Resultados experimentales	129
3.3.2	Discusión de los resultados	133
3.4	ESTUDIO DE LA INHIBICIÓN POR PRODUCTO	145
3.4.1	Resultados experimentales	145
3.4.2	Discusión de los resultados	148
3.5	EMPLEO DE GLICEROL CRUDO	155
3.5.1	Resultados experimentales	157
3.5.2	Discusión de los resultados	160
3.6	BIBLIOGRAFÍA CITADA	170

CAPÍTULO 4.	177
4.1 INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA	181
4.1.1 Resultados experimentales	182
4.1.2 Discusión de los resultados	186
4.2 INFLUENCIA DEL pH	191
4.2.1 Resultados experimentales	193
4.2.2 Discusión de los resultados	195
4.3 INFLUENCIA DE LA AGITACIÓN Y EL PORCENTAJE DE INÓCULO	199
4.3.1 Resultados experimentales	200
4.3.2 Discusión de los resultados	207
4.4 BIBLIOGRAFÍA CITADA	214
CAPÍTULO 5.	217
5.1 ESTUDIOS EN <i>ERLENMEYER</i> -INCUBADORA ORBITAL	222
5.1.1 Elección del tampón	222
5.1.2 Estudio de la agitación y de la concentración de biomasa	237
5.2 ESTUDIOS EN BIORREACTOR STBR	255
5.2.1 Efecto de k_La sobre la actividad enzimática (a_0)	274
5.2.2 Efecto de k_La sobre la producción de ácido glicérico	279
5.3 BIBLIOGRAFÍA CITADA	282
CAPÍTULO 6.	285
6.1 MODELO CINÉTICO EN <i>ERLENMEYER</i> -INCUBADORA ORBITAL	290
6.2 MODELO CINÉTICO EN BIORREACTOR TANQUE AGITADO	305
6.2.1 Cinética controlada por la biotransformación	305
6.2.2 Cinética controlada por la transferencia de oxígeno	309
6.3 BIBLIOGRAFÍA CITADA	314
CAPÍTULO 7.	315
7.1 PREPARACIÓN DEL BIOCATALIZADOR	322
7.1.1 Estudio del tiempo de crecimiento	322
7.1.2 Estudio de las etapas de crecimiento	326
7.2 REUTILIZACIÓN DEL BIOCATALIZADOR	335
7.3 PRODUCCIÓN DE DHA EN <i>FED-BATCH</i> (STBR)	339

7.4	ESTUDIO DE LA CONCENTRACIÓN DE LENTIKATS (STBR)	349
7.5	BIBLIOGRAFÍA CITADA.....	360
CAPÍTULO 8.		365
8.1	RESUMEN	369
8.2	CONCLUSIONES.....	376
8.3	RECOMENDACIONES	383
NOMENCLATURA		385
	LETRAS GRIEGAS	392
	SUBÍNDICES.....	393
	SUPERÍNDICES.....	394
LISTADO DE FIGURAS		395
	CAPÍTULO 1.....	397
	CAPÍTULO 2.....	397
	CAPÍTULO 3.....	398
	CAPÍTULO 4.....	400
	CAPÍTULO 5.....	401
	CAPÍTULO 6.....	403
	CAPÍTULO 7.....	405

SUMMARY

Current global energy supply is mainly based on fossil fuels usage (oil, coal and natural gas) since they are relatively low-priced and easy to extract and process. However, fossil-fuel burning is directly related with the emission of polluting gases, which causes greenhouse effect involved in climate change, triggering natural disasters such as droughts, floods and high temperatures with dramatic consequences. Furthermore, this energy resource is expected to run out in a near future. Thus, the replacement of fossil fuels by biofuels from renewable sources is imperative for securing a sustainable energy supply. As a response to this concern, strategic energy policies have been adopted by European Union in recent years to promote the consumption of energy from renewable sources.

Considering the high impact of transportation on total energy consumption in European Union (33 %), European Parliament and European Council published in 2009 the Directive 2009/28/EC, which defines that at least 10% of transport energy should come from renewable sources by 2020.

Among renewable biofuels, biodiesel has attracted great interest because it can be used directly in conventional diesel motors without any modification. Thus, it is not surprising the high increase in biodiesel production throughout the past decade as a consequence of the favourable regulatory framework set. Taking into account that biodiesel production leads to a stoichiometric generation of crude glycerol as byproduct, which involves nearly 10 wt % of the total biodiesel produced, the above mentioned situation has led to a glycerol glut, making impossible for traditional glycerol uses to be able to absorb the current oversupply of this product. As a result, there has been a sharp drop in glycerol prices, which has made the refining process of crude glycerol uneconomical, converting crude glycerol into an industrial waste for disposal. For this reason, searching of new uses of glycerol is imperative in order to make biodiesel processes not only economically more competitive, but also, more environmentally sustainable.

One of the most important value-added products that can be obtained from crude glycerol is dihydroxyacetone (DHA). This product is widely used as the active

ingredient in self-tanning lotions, since it provides a temporary skin tanning by means of Maillard reaction with the corneum layer, thus avoiding the harmful effects of UV ray exposure. Furthermore, DHA can be used as building block in organic synthesis of fine chemicals, such as anti-cancer drugs and biocompatible polymers for clinical applicability, for example, hydrogel based on MPEG-pDHA (polyethylene glycol and polycarbonate of dihydroxyacetone) has demonstrated its utility in the prevention of seroma, a common postoperative complication.

Due to non-toxic character of glycerol, it can be transformed into DHA by means of biotechnological route, as well as by chemical route. However, chemical route requires the use of expensive catalysts such as Au-Pd/C, Au/C, or Pt-Bi/C; hazardous compounds and high temperatures and pressures in many cases. In addition, the overoxidation of glycerol is very difficult to avoid, leading to poor selectivity values. In this respect, biotechnological route offers better performance, being the preferred one, since it takes place under mild operating conditions, with lower environmental impact, affordable cost and higher selectivity, although it has also some drawbacks that need to be overcome, such as low productivity. Amongst the microorganisms revised in the scientific literature that are able to produce DHA from glycerol, *Gluconobacter oxydans* stands out as the most efficient one.

In light of the above, the aim of the present PhD Thesis is to provide a deep knowledge of the DHA production process from glycerol using *G. oxydans* as biocatalyst in order to contribute to the development of an efficient, robust and predictable process for biodiesel derived crude glycerol revalorization. More specifically, this work has focused on the development of every single step involved in upstream bioprocess development, including culture medium study: nitrogen source requirements, substrate and product inhibition phenomena, comparison between the use of pure and crude glycerol; operating conditions study: temperature, pH, inoculum percentage and shaking speed; DHA production by resting cells: medium composition, biomass concentration, shaking speed and oxygen requirements; kinetic modelling study and DHA production by immobilized cells: biocatalyst preparation, reutilization, fed-batch mode and biocatalyst concentration. All these experiments will be described below.

Culture medium study

First of all, a comprehensive study of the culture medium and its influence on DHA production was accomplished. As *G. oxydans* needs the nutrients from nitrogen organic sources to synthesize glycerol dehydrogenase (enzyme responsible for the biotransformation) during growth, 7 experiments were carried out varying the concentration of yeast extract and peptone in the culture medium in an attempt to reduce its concentration, since they are costly and interfere with DHA purification downstream process. The results showed that the increase of nitrogen containing sources concentration led to an increase in both, final biomass concentration and glyceric acid production, as the main byproduct of this biotransformation. Surprisingly, DHA production rate did not increase with biomass concentration, remaining almost equal for all of the experiments. Through enzymatic activity tests, it was discovered that enzymatic activity (a_0) was proportional to the biomass concentration only when this concentration was below a certain value, indicating the existence of an unknown limiting factor when working with high biomass concentration. Furthermore, from the results of these tests it was deduced that enzymatic activity can be calculated directly as the initial DHA production rate.

Regarding the substrate inhibition phenomenon, 7 experiments were performed by varying initial glycerol concentration up to 133 g/L. Contrary to what had been published in literature, substrate inhibition was not detected, since enzymatic activity was the same for all experiments, thus, entirely independent of initial glycerol concentration. However, glyceric acid production was favoured at high glycerol concentrations, lowering the pH. This effect allowed the identification of a critical pH value below 4, which causes the detainment of DHA production. Likewise, in higher initial glycerol concentration experiments, the accumulation of DHA provoked the slowdown in the production rate, suggesting product inhibition. In order to confirm this, 4 experiments were carried out at different DHA initial concentrations. It was shown that not only DHA concentration, but also the time of exposure to this compound, adversely affects the production rate. Additionally, a minimum DHA inhibitory concentration of 159 g/L was calculated from Hinshelwood model adapted to this process. According to this, the production process would cease completely from this theoretical concentration.

The feasibility of using crude glycerol instead of pure glycerol was studied through 7 experiments performed with different concentrations of pure and crude glycerol supplied by Biocom Energía S.L (a Spanish biodiesel manufacturer). It was confirmed that the production rate was similar to pure glycerol when 30 g/L of crude glycerol was used. The main difference was found in the biomass production, which was higher in crude glycerol experiments, probably due to the presence of phosphates and other salts. However, higher crude glycerol concentrations were found to be detrimental for the process because of the impurities accumulation and higher byproduct production.

Operating conditions study

Following, the influence of operating conditions on DHA production was studied. Thus, enzymatic activity was assayed at 6 different temperatures ranging from 25 °C to 37 °C. Optimal temperature was established at 30 °C because of the maximization of enzymatic activity, as well as volumetric productivity. With respect to pH, several strategies were tested, including free evolution and pH shift control. No differences were found in terms of DHA production rate. However, higher initial pH (7) led to an increase in glyceric acid production. Therefore, lower pH values are advisable, provided that pH remains above 4 to prevent the cease of the process.

A simultaneous study of the inoculum percentage (from 5 % to 40 %) and shaking speed (from 100 to 400 rpm) showed that higher biomass concentration requires higher shaking speeds in order to get a proportional enzymatic activity, thus, suggesting that the limiting factor is the availability of oxygen per cell. Nevertheless, this factor did neither affect to cell growth, nor glyceric acid production.

DHA production by resting cells

DHA production carried out by forcing bacteria enter the resting cells state (inability to growth) through removing nitrogen source from the culture medium has several advantages from an operational perspective, such as utilisation of a simplified production medium composed solely by substrate and buffer, facilitation of further downstream steps (product isolation and purification) and elimination the need for sterilisation.

Given the strengths of this approach, a large number of experiments were carried out to study DHA production process by resting cells. Firstly, 13 experiments were conducted at different biomass concentrations to elucidate the best choice for buffer. Acetate buffer showed good results, since it was able to maintain pH above 4 even in the experiment with the highest biomass concentration (the more biomass, the more glyceric acid production). Secondly, 24 experiments were performed at different biomass concentration and shaking speeds to evaluate its effect on enzymatic activity. These results enabled the formulation of a mathematical model based on Michaelis-Menten equation, which is able to predict enzymatic activity from biomass concentration and oxygen transport coefficient (k_{La}).

In order to provide insight on bacterial oxygen requirements, quantified as specific oxygen uptake rate (q_{O_2}), 7 experiments were carried out at different stirrer speeds ranging from 300 to 900 rpm in a stirrer tank bioreactor (STBR), measuring dissolved oxygen concentration in the broth and oxygen content in the output gas flow to calculate oxygen transport rate (OTR), oxygen uptake rate (OUR), q_{O_2} and k_{La} from oxygen mass balance. The effect of k_{La} values on glycerol dehydrogenase activity and q_{O_2} were analysed. The results showed that DHA production process was controlled by oxygen transport rate when $k_{La} < 0.0142 \text{ s}^{-1}$, since an increase in enzymatic activity and q_{O_2} with k_{La} was observed. Thus, critical dissolved oxygen concentration was established in 10 % of the oxygen saturation concentration value. From this value ($k_{La} > 0.0142 \text{ s}^{-1}$) a_0 and q_{O_2} are independent of k_{La} , showing that the overall process is governed by biotransformation rate. Furthermore, it was noticed a decrease in cell viability with time, especially at higher stirrer speed rates, suggesting hydrodynamic stress. Amazingly, enzymatic activity did not decrease in spite of hydrodynamic stress, showing the robustness of glycerol dehydrogenase enzyme located in cell membrane.

Kinetic modelling

The vast quantity of data collected on the DHA production by resting cells allowed the formulation of a non-segregated, unstructured kinetic model for every of the two situations found: oxygen limiting condition, in which the overall process rate is governed by oxygen transfer rate, and non-oxygen limiting condition, in which the overall process rate is governed by biotransformation rate. In the first situation, DHA

SUMMARY

production rate (R_{DHA}) and glycerol consumption rate (R_{Glic}) are dependent of both, biomass concentration (C_X) and dissolved oxygen concentration (C_{O_2}), whereas in the second situation these rates are dependent of substrate (C_{Glic}) and biomass concentrations, following a Michaelis-Menten type kinetics as shown in the table below.

Oxygen limiting condition	Non-oxygen limiting condition
$R_{DHA} = \frac{Y_{DHA,O_2}^{max} \cdot C_X(t)}{k_X + C_X(t)} \cdot k_L a \cdot (C_{O_2}^* - C_{O_2}(t))$	$R_{DHA} = \frac{k_{cat} \cdot C_{Glic}}{k_m + C_{Glic}} \cdot C_X$
$R_{Glic} = -v_G \cdot \frac{Y_{DHA,O_2}^{max} \cdot C_X(t)}{k_X + C_X(t)} \cdot k_L a \cdot (C_{O_2}^* - C_{O_2}(t))$	$R_{Glic} = -v_G \cdot \frac{k_{cat} \cdot C_{Glic}}{k_m + C_{Glic}} \cdot C_X$

The good fitting of oxygen limiting condition model to experimental data from shake flasks, in which there was no possibility of measuring dissolved oxygen concentration, indicates that these experiments were carried out under inadequate oxygen supply. Furthermore, by comparison between the results in both, shake flasks and STBR, it was possible to reach the conclusion that $k_L a$ values calculated by an empirical equation for shake flasks were overestimated because that equation did not take into account the additional resistance to oxygen transfer, which involves using a cotton plug in the flask neck for ensuring sterility.

DHA production by immobilized cells in LentiKats

Finally, in order to lessen the impact of product inhibition and hydrodynamic stress, increase cellular density in bioreactor to enhance productivity, facilitate separation of biocatalyst and promote its reutilisation, a preliminary study on *G. oxydans* immobilization (protection) in LentiKats was performed. This included 6 experiments to determine optimal time for bacterial growth in LentiKats and 18 experiments to assess the appropriate number of bacterial growth stages in fresh medium with the aim to reach an optimal bacterial occupation of the biocatalyst without affecting productivity through clogging of the particle porous, which can prevent the substrate from reaching the cells located inside the particle. Furthermore, preliminary studies of biocatalyst reutilisation in resting cells batch mode demonstrated that enzymatic activity remained almost intact

after 6 production cycles (144 h). Additionally, an experiment in fed-batch mode was carried out in order to allow DHA accumulation and test the protection provided by immobilization towards this toxic compound. Unexpectedly, product inhibition was more pronounced in the experiment with immobilized cells than in the experiment with free cells and the overall process rate was slower with immobilized cells as well. It was concluded from a specific study in STBR that a concentration of 288 g/L is necessary to reach the same production rate as obtained with free cells. In addition, an elementary analysis (C, H, N, S) of LentiKats, gel to make LentiKats and biomass milled samples enabled to estimate biomass concentration in LentiKats. This estimation revealed that, in spite of having 10 times more biomass than experiments with free cells, experiments with LentiKats showed lower production rate. The reason for this can be found in the existence of a strong internal diffusion resistance, as indicated by Weisz-Prater criterion. This finding may explain why product inhibition was higher in LentiKats than in free cells, as long as DHA is accumulated inside the particle porous as a consequence of internal diffusion resistance. Thus, future research should be directed to find adequate porous carriers to avoid internal diffusion resistance.

This work provides a comprehensive knowledge of DHA production process from biodiesel derived crude glycerol using *G. oxydans* that allows creating a sound foundation to implement an efficient, robust and reproducible to large scale and predictable biotechnological process to contribute to the development of the future biorefineries.

CAPÍTULO 1.

INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1.

INTRODUCCIÓN

Índice

1.1	AUGE DEL MERCADO DEL BIODIÉSEL.....	13
1.2	PROCESO DE PRODUCCIÓN DE BIODIÉSEL.....	15
1.3	PROBLEMÁTICA DEL GLICEROL.....	19
1.4	REVALORIZACIÓN DEL GLICEROL HACIA PRODUCTOS DE ALTO VALOR AÑADIDO.....	21
1.4.1	Oxidación parcial	22
1.4.2	Hidrogenólisis	24
1.4.3	Deshidratación selectiva.....	24
1.4.4	Esterificación y transesterificación.....	25
1.4.5	Eterificación y polimerización.....	25
1.4.6	Carboxilación	26
1.4.7	Gasificación	26
1.4.8	Biocatálisis.....	27
1.5	DIHIDROXIACETONA.....	30
1.5.1	Usos	30
1.5.2	Obtención: vía biotecnológica vs vía química.....	34
1.6	ETAPAS CLÁSICAS DEL DESARROLLO DE BIOPROCESOS	40
1.7	OBJETIVO Y ALCANCE DEL TRABAJO	42
1.8	BIBLIOGRAFÍA.....	44

CAPÍTULO 1.

INTRODUCCIÓN

La energía procedente de la quema de combustibles fósiles ha permitido el desarrollo de las sociedades modernas desde el punto de vista científico, tecnológico, social y económico, generando un bienestar sin precedentes, desconocido antes de la Segunda Revolución Industrial. Sin embargo, las emisiones asociadas a esta forma de obtener energía causan efectos indeseados en el medio ambiente, tales como el efecto invernadero, la lluvia ácida o el calentamiento global, con consecuencias que pueden llegar a ser dramáticas. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), unas 160.000 personas mueren cada año como consecuencia de efectos colaterales asociados a sequías, inundaciones y altas temperaturas provocadas por el cambio climático, cifra que podría doblarse para el año 2020 (Asif y Muneer, 2007).

Por otro lado, el carácter no renovable de los combustibles fósiles, la distribución desigual de los recursos fósiles y la elevada fluctuación de sus precios debido a la inestabilidad política de los países productores y a la creciente demanda mundial por parte de las naciones en desarrollo, no aseguran un suministro sostenido en el tiempo, poniendo en riesgo la seguridad energética (Chester, 2010). Por ello, existe una necesidad imperante de sustituir los combustibles fósiles por fuentes de energía de carácter renovable, más respetuosas con el medio ambiente, accesibles y con precios asequibles para satisfacer los requerimientos energéticos de las sociedades actuales y futuras.

1.1 AUGUE DEL MERCADO DEL BIODIÉSEL

En el contexto energético descrito en los párrafos anteriores no puede obviarse la contribución del transporte al consumo total de energía, que en el caso de la Unión Europea supone algo más de un 33 %, por delante incluso del sector industrial, tal y como muestra la Figura 1.1, elaborada con datos del año 2014. Es por ello que se han desarrollado políticas comunitarias dirigidas al fomento del uso de fuentes de energía renovables para el sector transporte. De este modo, la Directiva 2009/28/CE establece que para el año 2020 el 10 % del combustible destinado al transporte debe proceder de fuentes de energía renovables, como pueden ser los biocarburantes. Todo ello con el fin

de reducir las emisiones de gases de efecto invernadero y disminuir la dependencia de las importaciones energéticas. Asimismo, esta Directiva insta a los gobiernos a implementar medidas de ahorro y eficiencia energética.

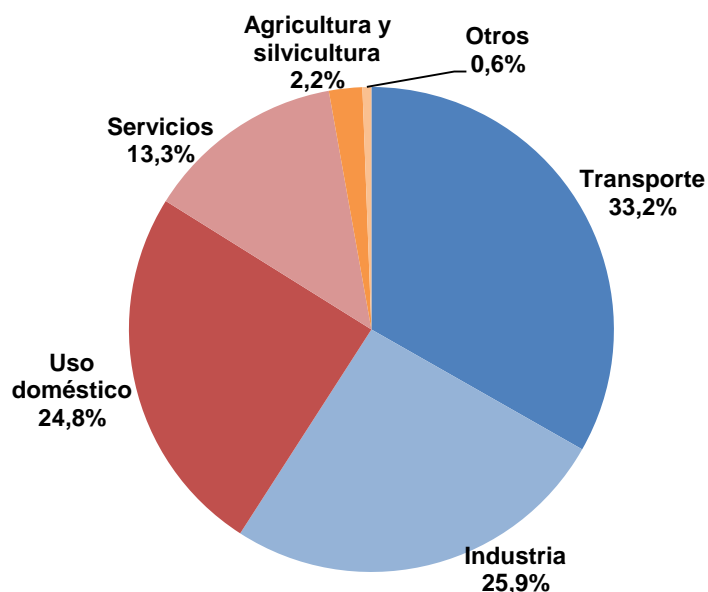


Figura 1.1. Distribución del consumo final de energía para los países de la UE-28 (Eurostat, 2014).

Teniendo en cuenta que, a diferencia de otros biocombustibles, el biodiésel es muy compatible con el diésel convencional y puede ser mezclado con éste casi en cualquier proporción, o incluso, usarse puro en los motores diésel sin necesidad de realizar ninguna modificación (Agarwal, 2007), no es de extrañar que la producción de biodiésel en la Unión Europea constituya el 80 % de la producción total de biocombustibles líquidos destinados al transporte (EU Biofuels Annual report, 2016). Asimismo, el marco regulatorio favorable mencionado con anterioridad ha propiciado que, tanto el consumo, como la producción de este biocombustible en la Unión Europea hayan experimentado un aumento considerable en los últimos años, tal y como muestra la Figura 1.2, destacando como principales productores Alemania, Francia, Holanda, España y Polonia. No obstante, existe un pequeño desequilibrio entre el consumo y la producción que hace que la Unión Europea tenga que importar biodiésel para satisfacer su demanda interna.

Por último, cabe destacar, como puede apreciarse en la Figura 1.2, que a partir del año 2009 el crecimiento de la producción de biodiésel ha sido mucho más suave que la tendencia de años anteriores, lo que parece deberse a estrategias de *dumping* llevadas a cabo por Argentina e Indonesia (principales exportadores de biodiésel a la UE). Como respuesta, la Unión Europea impuso a partir del año 2013 y por un período de 5 años, aranceles al biodiésel procedente de estos dos países con el objetivo de restablecer una competencia leal y reactivar la producción de biodiésel en el marco europeo (EU Biofuels Annual report, 2016).

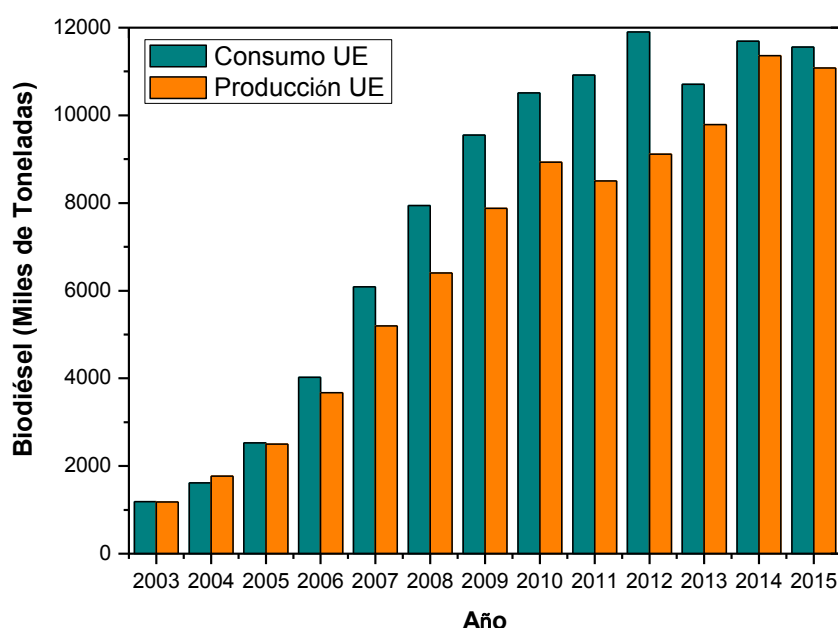


Figura 1.2. Producción y consumo de biodiésel en la Unión Europea durante los años 2003-2015 (Eurostat, 2017).

1.2 PROCESO DE PRODUCCIÓN DE BIODIÉSEL

El biodiésel está formado por una mezcla de ésteres mono-alquílicos de ácidos grasos de cadena larga y corta obtenidos a partir de fuentes renovables y abundantes como son los aceites vegetales y grasas animales, mediante un proceso de transesterificación. En este proceso, una molécula de triglicérido reacciona con tres moléculas de alcohol, formándose los alquil-ésteres de ácidos grasos (biodiésel) y glicerol, que constituye el principal subproducto (en realidad un coproducto), obteniéndose 1 kg de glicerina por cada 10 kg de biodiésel, según la reacción global mostrada en la Figura 1.3 (Amaral y col., 2009).

El alcohol empleado en la transesterificación suele ser de cadena corta (metanol o etanol) para evitar la formación de una emulsión estable entre la glicerina y el biodiésel al finalizar la reacción. (Schuchardt y col., 1998; Marchetti y col., 2007). Además, la reacción transcurre en presencia de un catalizador, que puede ser de distinta naturaleza: ácido, básico o enzimático (Tan y col., 2013).

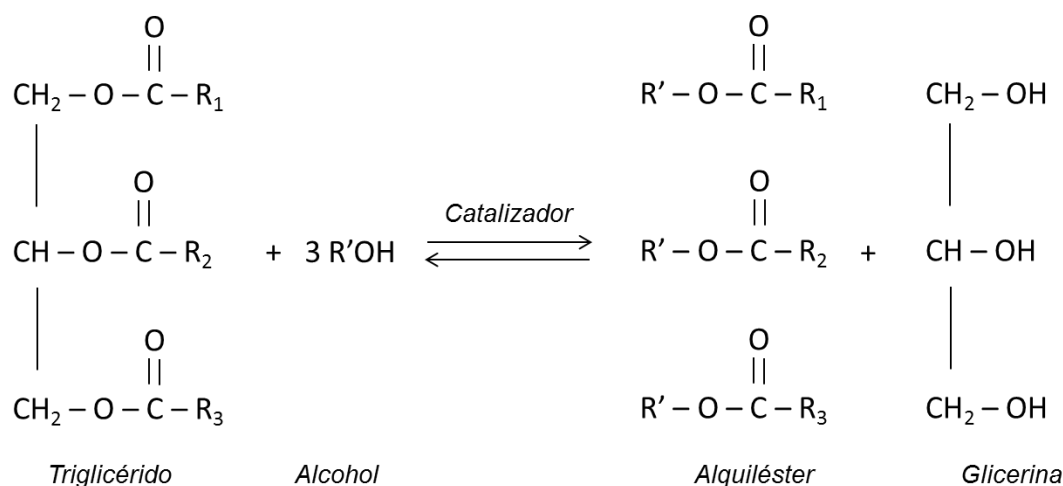


Figura 1.3. Reacción de transesterificación para la producción de biodiésel.

A partir de la reacción anterior, se obtiene un biocombustible biodegradable, no tóxico y libre de compuestos azufrados (precursores de la lluvia ácida cuando se combinan con la humedad atmosférica) y aromáticos (con propiedades carcinogénicas y mutagénicas). No obstante, su principal ventaja medioambiental radica en el ciclo cerrado de carbono que presenta su uso, ya que la cantidad de dióxido de carbono emitido durante la combustión es equivalente a la cantidad de dióxido de carbono fijada por los vegetales durante su crecimiento, como se muestra en la Figura 1.4. Si bien este balance ha sido puesto en cuestión, por diversas razones.

Además, lo que no contempla la Figura 1.4 es que la emisión neta de dióxido de carbono es positiva debido al uso de combustibles fósiles en la fabricación de los fertilizantes empleados en los cultivos y en la fabricación de metanol. A pesar de ello, se estima que la contribución del biodiésel al efecto invernadero se reduce a la mitad en comparación con el diésel fósil (Puppan, 2002).

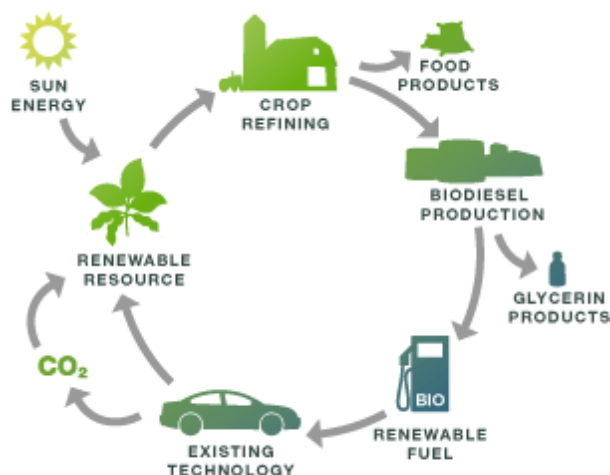


Figura 1.4. Esquema del ciclo de vida del biodiésel.

Otro punto controvertido con respecto al biodiésel es la procedencia de los aceites empleados para su producción. Así, actualmente se distinguen tres tipos de biodiésel: de primera, de segunda y de tercera generación en función de la materia prima empleada. El biodiésel de primera generación es aquél que emplea aceites procedentes de cosechas que pueden destinarse a alimentación humana o de ganado (maíz, soja, palma, cacahuete, caña de azúcar etc.), compitiendo directamente por el suelo destinado a alimentación e influyendo negativamente en los precios de alimentos básicos de consumo (Kansedo y col., 2009).

El biodiésel de segunda generación se caracteriza por emplear como materia prima cosechas no destinadas a alimentación (jatropha, tabaco, gramíneas etc.) que se cultivan aprovechando áreas marginales improductivas en cultivos alimentarios, ya que pueden crecer en zonas áridas y en suelos con escasos nutrientes. También se incluyen en esta categoría los aceites de cocina usados y las grasas procedentes de animales (Tan y col., 2013). Este último punto genera controversia porque suelen emplearse animales contaminados, pudiendo constituir un riesgo biológico (Janaun y Ellis, 2010).

Finalmente, el biodiésel conocido como de tercera generación, se basa en el empleo de algas o microalgas como materia prima para obtener los aceites. Estas algas se reproducen rápidamente y son fáciles de obtener en foto-biorreactores que no compiten por el suelo cultivable. Además, presentan un elevado rendimiento en términos de cantidad de aceite obtenido por superficie en comparación con los cultivos de plantas (Rodolfi y col., 2009).

A modo de resumen, se presentan en la Tabla 1.1 las principales ventajas y desventajas de cada uno de los tipos de biodiésel descritos en los párrafos anteriores.

Tabla 1.1. Principales ventajas y desventajas de las distintas materias primas empleadas para la obtención del biodiésel de primera, segunda y tercera generación.

Tipo de biodiésel	Materia prima		Ventajas	Desventajas
	Tipo	Ejemplos		
Primera generación	Vegetales	Maíz, soja, caña de azúcar, cacahuete	<ul style="list-style-type: none"> - Cultivos establecidos y disponibles - Tecnología sencilla y disponible para su transformación - Más económicos 	<ul style="list-style-type: none"> - Compiten por el suelo con cultivos destinados a alimentación - Impacto en los precios de alimentos básicos
Segunda generación	Vegetales/ animales	Jatropha, tabaco, salmón, aceite de cocina usado	<ul style="list-style-type: none"> - No compiten con cultivos destinados a alimentación - Se cultivan en áreas marginales e improductivas - Materia prima más económica 	<ul style="list-style-type: none"> - Menor rendimiento - Tecnología más compleja - Mayor coste final del biodiésel
Tercera generación	Algas/ microalgas	<i>Nannochloropsis</i> sp., <i>Chlorella</i> sp.	<ul style="list-style-type: none"> - Mayor contenido en aceite por superficie - No requiere terrenos cultivables - Rápida proliferación 	<ul style="list-style-type: none"> - Requiere condiciones muy controladas de temperatura - Difícil escalado - Elevado coste en la extracción del aceite

La principal barrera a la comercialización del biodiésel es su precio final, que todavía no es competitivo frente al precio de los combustibles fósiles (Agarwal, 2007; Demirbas, 2009), debiéndose recurrir a incentivos fiscales para fomentar su consumo (Sorda y col., 2010). Se estima que el 75 % del coste total del biodiésel lo constituye el precio de la materia prima vegetal. Por ello, es fundamental la selección del cultivo apropiado. Teniendo en cuenta que para superar las limitaciones éticas derivadas del uso de biodiésel de primera generación es necesario recurrir a tecnologías más caras, los esfuerzos deben encaminarse a mejorar los rendimientos de estas tecnologías con el objetivo de disminuir los costes económicos (Narasimhan y col., 2016). No obstante, otra manera de hacer más competitivo el biodiésel frente a los combustibles fósiles, es mediante la valorización o comercialización de su principal subproducto, la glicerina.

1.3 PROBLEMÁTICA DEL GLICEROL

La glicerina o glicerol son términos que actualmente se usan indistintamente para denominar el 1,2,3-propanotriol, aunque tradicionalmente el término glicerina hacía referencia a los productos comerciales (Kenar, 2007). Este compuesto se caracteriza por ser un líquido muy viscoso, altamente higroscópico, soluble en agua y en disolventes polares, incoloro, inodoro y con cierto sabor dulce, no tóxico para el ser humano, ni para el medio ambiente y biodegradable, lo que le confiere un gran interés en el entorno de la química verde (Gu y Jérôme, 2010). Las principales propiedades físicas de este compuesto se resumen en la Tabla 1.2.

Tabla 1.2. *Propiedades físicas del glicerol a 25 °C y presión atmosférica (Tan y col., 2013).*

Propiedades físicas	Valor
Fórmula molecular	$C_3H_8O_3$
Peso molecular (g/mol)	92,09
Densidad (g/cm ³)	1,264
Viscosidad (Pa·s)	1,5
Tensión superficial (mN/m)	64
Punto de fusión (°C)	17,9
Punto de ebullición (°C)	290
Punto de inflamabilidad (°C)	177

Históricamente, gracias a sus propiedades físicas, la glicerina ha sido ampliamente utilizada como aditivo en productos de muy diversa naturaleza. Por su alta capacidad humectante se ha empleado como ingrediente en la formulación de lociones y cremas para la piel; por su viscosidad, suavidad y sabor dulce ha encontrado aplicación en la elaboración de dentífricos; también se ha empleado como aditivo en el tabaco para prevenir su desecación y controlar su velocidad de combustión; se ha añadido a bebidas y productos alimenticios; además de emplearse en la fabricación de resinas alquídicas, embalajes, etc. (Morrison, 2000). Sin embargo, la industria que mayor demanda de glicerina ha experimentado es la del cuidado personal y farmacéutica, respondiendo al deseo de los consumidores de usar productos amigables con el medio ambiente (Kenar, 2007), pasando de una demanda del 26 % del glicerol total en el año 1995 a un 34 % en el año 2006 (Ayoub y Abdullah, 2012).

Tradicionalmente la producción de glicerina ha estado vinculada a la industria del jabón, donde se producía como subproducto en la saponificación de aceites vegetales. A partir de la segunda mitad del s. XX, con el desarrollo de la industria petroquímica, surgieron nuevos procesos (vía química) de obtención de glicerol a partir de óxido de propileno (Ayoub y Abdullah, 2012). Sin embargo, en la actualidad, con el auge experimentado en la producción de biodiésel a nivel mundial y el incremento en proporción del glicerol crudo disponible en el mercado como efecto colateral (pasando de 200.000 t en 2003, a 600.000 t en 2006 y a más de 2 millones de toneladas en 2011), se ha producido el cierre de numerosas fábricas de glicerol obtenido de las formas indicadas, convirtiéndose la industria del biodiésel en el principal suministrador de este compuesto. A modo de ejemplo, Dow Chemical cerró en 2006 su planta en Texas, con una producción de glicerol de 60.000 t/año (la mayor del mundo), Procter & Gamble cerró el mismo año su planta en Londres, con una capacidad de 12.500 t/año, y unos meses más tarde se produjo el cierre de la planta de Solvay en Francia (Ciriminna y col., 2014).

En este contexto, el mercado de la glicerina no ha sido capaz de absorber el exceso de oferta porque los usos tradicionales requieren este producto en pequeñas cantidades. Además, el glicerol crudo obtenido tras la transesterificación presenta impurezas como metanol (tóxico), sales inorgánicas (restos de catalizador), metales y ácidos grasos libres, variando su contenido en glicerina entre un 60-80 % dependiendo del proceso empleado (Ayoub y Abdullah, 2012), requiriendo un proceso de purificación previo a su comercialización, ya que gran parte del mercado de la glicerina demanda un producto con un alto grado de pureza (99,5-99,7 %). Aunque el exceso de metanol es fácilmente recuperable mediante una destilación *flash* gracias a su elevada volatilidad, la purificación del glicerol por destilación es mucho más costosa debido a su elevado punto de ebullición (Tabla 1.2). Habida cuenta del descenso sin precedentes de los precios del glicerol purificado provocado por el exceso de oferta: pasando de 4.000 €/t en el año 2000 a 450 €/t en Europa en el año 2010, con una tendencia similar en el mercado estadounidense (ver Figura 1.5), la purificación del glicerol crudo no resulta económicamente atractiva, de modo que este subproducto ha pasado a considerarse un residuo industrial sin ningún valor añadido, con la consiguiente problemática asociada a su eliminación (Johnson y Taconi, 2007; Ciriminna y col., 2014).

En este escenario, se hace evidente la necesidad de buscar usos alternativos al glicerol para conseguir que la producción de biodiésel sea medioambientalmente más sostenible y económicamente más rentable, pudiendo dar lugar a una reducción en el precio del biodiésel y, con ello, hacerlo más competitivo frente a los combustibles fósiles.

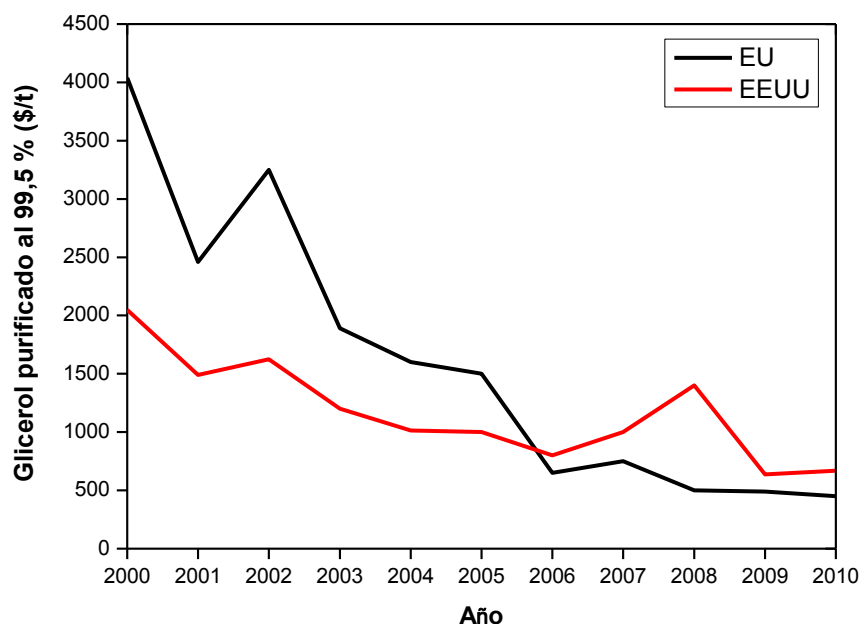


Figura 1.5. Evolución de los precios del glicerol purificado al 99,5 % en el mercado europeo y estadounidense entre los años 2000 y 2010 (Ciriminna y col., 2014).

1.4 REVALORIZACIÓN DEL GLICEROL

El glicerol es una molécula con potencial para reaccionar debido a la presencia de dos grupos alcoholes primarios y otro secundario que pueden ser reemplazados por otros grupos funcionales, dando lugar a multitud de compuestos de alto valor añadido. Además, está disponible en el mercado en abundancia y a precios asequibles, tal y como se ha puesto de relieve en los apartados anteriores. Por estos motivos, el Departamento Americano de Energía (DOE) ha incluido esta molécula en la lista de los 10 compuestos que pueden obtenerse a partir de biomasa con mayor potencial para convertirse en *platform chemicals* o precursores para la producción de derivados e intermedios de especial interés en la industria química (Bozell y Petersen, 2010). La elaboración de esta lista se enmarca dentro del interés por desarrollar tecnologías a partir de biomasa para producir los compuestos químicos que actualmente se producen a partir del petróleo,

con el objetivo de sustituir las refinerías de petróleo por biorrefinerías de biomasa más sostenibles con el medio ambiente. Por ello, la búsqueda de nuevos productos derivados del glicerol no sólo resulta de interés para favorecer la industria del biodiésel, sino que adquiere una relevancia mayor por su contribución al desarrollo de las futuras biorrefinerías en un contexto más amplio.

La transformación del glicerol en compuestos de alto valor añadido se puede abordar a través de reacciones químicas de oxidación parcial, hidrogenolisis, deshidratación, esterificación/transesterificación, eterificación, polimerización, carboxilación, pirolisis y gasificación. Pero también, debido a su carácter no tóxico, es apto como sustrato para enzimas y microorganismos, pudiéndose llevar a cabo la transformación por vía biocatalítica. En la Figura 1.6 se muestra la gran variedad de productos derivados que se pueden obtener a través de las principales rutas de revalorización del glicerol. En muchos casos, la transformación puede llevarse a cabo mediante vía química y vía biotecnológica. En los párrafos siguientes se van a describir las distintas vías de revalorización, así como la utilidad de los compuestos resultantes de mayor interés.

1.4.1 Oxidación parcial

La oxidación parcial del glicerol por vía química se lleva a cabo a través de reacciones catalizadas generalmente por metales nobles soportados que permiten la reducción de la temperatura de operación. Sin embargo, el glicerol presenta tres grupos hidroxilo, que son bastante reactivos, dificultando la oxidación selectiva de uno de ellos hacia un único producto de interés, obteniéndose habitualmente una mezcla de distintos productos de oxidación parcial. El principal reto de esta ruta de revalorización del glicerol es, por tanto, mejorar la selectividad hacia el producto de interés para facilitar su separación posterior. Para ello, es importante diseñar cuidadosamente el catalizador y controlar las condiciones de reacción. Por ejemplo, en medio básico se favorece la oxidación del alcohol primario, produciéndose ácido glicérico como producto principal, mientras que, en condiciones ácidas, se favorece la oxidación del alcohol secundario, obteniéndose dihidroxiacetona como producto principal; aunque en medio básico la distribución de productos puede variar en función del soporte empleado en el catalizador (Rodrigues y col., 2011).

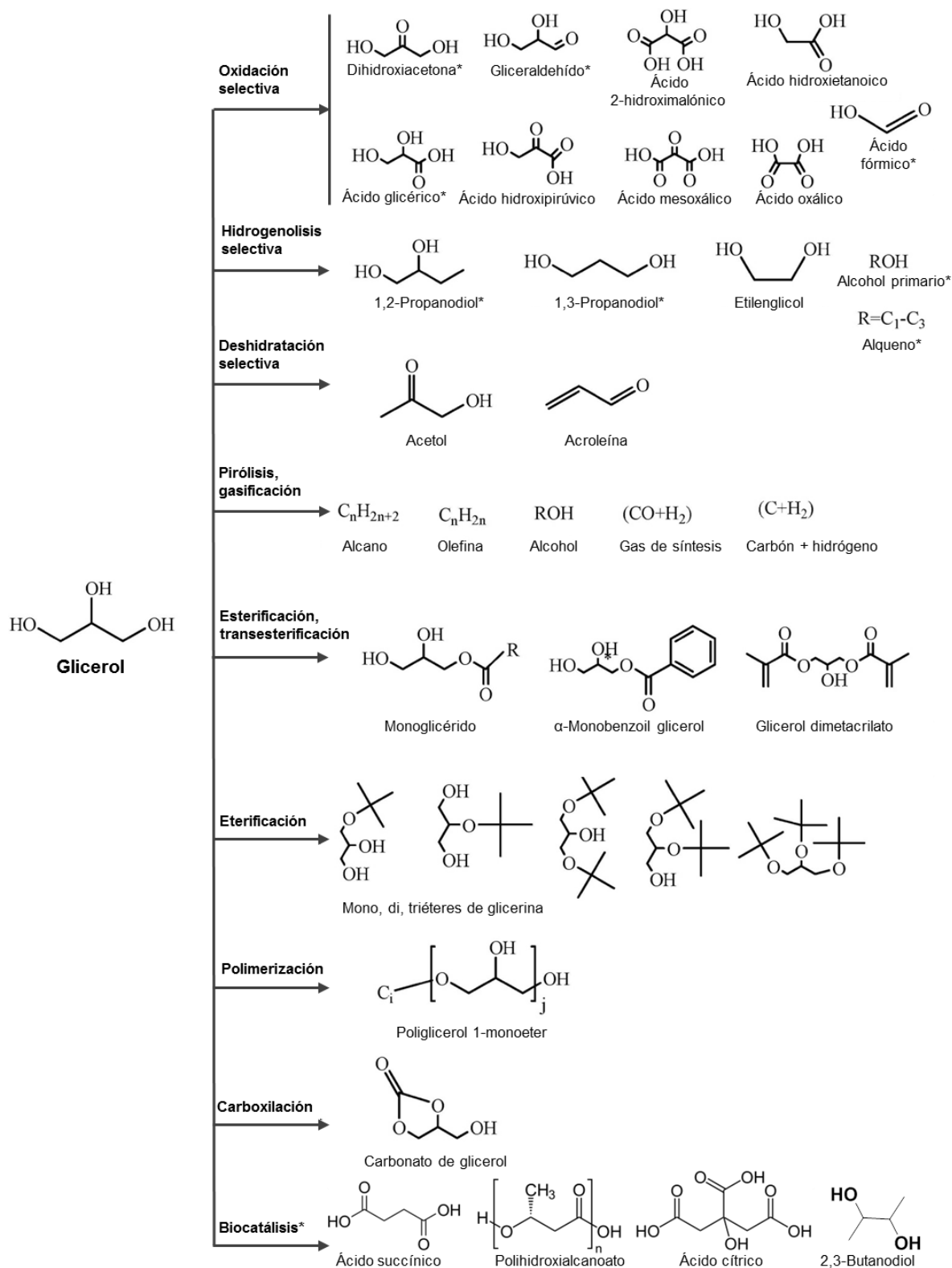


Figura 1.6. Principales rutas de revalorización del glicerol por vía química y biotecnológica (Zhou y col., 2008; Bozell y Petersen, 2010). Los compuestos con asterisco se pueden obtener también por biocatálisis.

Dentro del elevado número de productos que se pueden obtener por esta vía, destacan la dihidroxiacetona, el ácido glicérico, el ácido mesoxálico y el ácido hidroxietanoico.

La dihidroxiacetona es interesante por su potencial como *building block* o precursor para la síntesis de numerosos compuestos de química fina y por su interés en cosmética, como se detallará en el apartado 1.5.1. El ácido glicérico y sus derivados presentan actividad biológica, pudiendo actuar como estimulantes hepáticos o combatiendo el colesterol, pero también presentan aplicación como surfactantes funcionales o como monómeros para la síntesis de polímeros u oligoésteres, con potenciales aplicaciones en la industria farmacéutica, como por ejemplo, el diseño de sistemas de administración de fármacos (Habe y col., 2009). En cuanto al ácido mesoxálico y sus derivados, han demostrado ser agentes quelantes con eficacia demostrada anti-VIH y en el tratamiento de la diabetes (Xin y col., 2012). Finalmente, el ácido hidroxietanoico o ácido glicólico, puede emplearse en la fabricación de polímeros biodegradables con diversos usos (Makadia y Siegel, 2011).

1.4.2 Hidrogenolisis

La hidrogenolisis consiste en la eliminación selectiva de uno de los grupos hidroxilo de la molécula de glicerol (reducción selectiva), por reacción con H_2 a alta presión y temperatura (del orden de 180 °C y 80 bar) y en presencia de algún catalizador. Los principales productos de esta reacción son 1,2-propanodiol (1,2-PD) y 1,3-propanodiol (1,3-PD). El 1,2-PD se emplea como crioprotector en productos alimenticios, en cosméticos, como aditivo en la formulación de lubricantes y anticongelantes, entre otros (Zhou y col., 2008). Por su parte, el 1,3-PD co-polimerizado con ácido tereftálico origina un poliéster comercializado como SORONA en el caso de DuPont y CORTERRA en el caso de Shell, ampliamente utilizados en la fabricación de alfombras y fibras textiles porque presentan propiedades únicas en cuanto a resistencia química, estabilidad a la luz, elasticidad y tintura (Chaminand y col., 2004).

1.4.3 Deshidratación selectiva

La reacción de deshidratación es aquella en la que se produce la pérdida de una molécula de agua generando dobles enlaces. El principal producto de la deshidratación del glicerol es la acroleína. Este producto puede obtenerse calentando una disolución

acuosa de glicerol a 190 °C en presencia de ácido sulfúrico, aunque con bajos rendimientos (49 %). Otra opción que se ha explorado es llevar a cabo la reacción en agua supercrítica (250-390 °C y 25-35 MPa) usando ácidos inorgánicos o sales como catalizadores. Sin embargo, el empleo de sales y ácidos inorgánicos no es recomendable en esas condiciones de presión y temperatura por los problemas de corrosión que pueden ocasionar (Chai y col., 2007). Por ello, en estudios más recientes se emplean catalizadores heterogéneos como óxido de wolframio soportado en óxidos de zirconio, sílice y alúmina a presión atmosférica y 315 °C, con mejores rendimientos (60 %) (Chai y col., 2014).

El interés comercial de la acroleína radica en que constituye el precursor del ácido acrílico, que a su vez, se emplea en la producción del poliacrilato de sodio, un polímero súper absorbente ampliamente utilizado en la fabricación de toallitas higiénicas, pañales y en la industria papelera para retener agua en la producción de papel (Talebian-Kiakalaieh y col., 2014).

1.4.4 Esterificación y transesterificación

Los principales productos de estas reacciones son los ésteres monoglicéridos que se obtienen bien por transesterificación de glicerol con metilésteres de ácidos grasos, o bien, por esterificación de glicerol con ácidos grasos. No obstante, dado que la reactividad de los tres grupos hidroxilo del glicerol es muy similar, se suele obtener una mezcla de monoglicéridos y diglicéridos, en distinta proporción en función de las condiciones de reacción y del catalizador empleados (Zhou y col., 2008). Las aplicaciones de los ésteres de glicerol dependen de su peso molecular. Así, los ésteres de bajo peso molecular son líquidos y se emplean mayoritariamente como disolventes, aunque algunos de ellos presentan olor afrutado y, por ello, son ideales como aditivos en perfumes y saborizantes artificiales. Por otro lado, los ésteres de alto peso molecular se usan como aditivos en combustibles, pero también en la industria cosmética como emolientes y aditivos en desodorantes y cremas (Brewster y col., 1987; Molinero y col., 2014).

1.4.5 Esterificación y polimerización

A través de reacciones de esterificación del glicerol se pueden obtener éteres terciarios ramificados (GTBE) que pueden utilizarse como aditivos oxigenados en la

reformulación de mezclas de diésel y biodiésel con el objetivo de reducir las emisiones de partículas sólidas, hidrocarburos, monóxido de carbono y aldehídos (Pagliaro y col., 2007). Además, aquellos éteres terciarios muy ramificados podrían emplearse como aditivos en las gasolinas para aumentar el número de octano y sustituir al éter metil terbutílico (MTBE), cuestionado por su impacto medioambiental y en la salud (Irawadi y col., 2007). La unión de varias moléculas de glicerol a través de enlaces tipo éter da lugar a oligómeros, que unidos entre sí, generan polímeros de glicerol con importantes aplicaciones técnicas. Los oligómeros de glicerol están ganando terreno en cosmética, como lubricantes y como aditivos alimenticios. Generalmente, la síntesis de oligómeros de glicerol se lleva a cabo mediante catálisis homogénea en medio básico, aunque se está estudiando la posibilidad de emplear catalizadores heterogéneos como zeolitas por la facilidad de separación y reutilización, aunque, por ahora, con peores resultados (Irawadi y col., 2007).

1.4.6 Carboxilación

El producto principal de la carboxilación del glicerol es el carbonato de glicerina que presenta un número elevado de potenciales aplicaciones, como por ejemplo: componente en membranas de separación de gases, en surfactantes, en espumas de poliuretano, puede actuar como disolvente no volátil de barnices, pegamentos, cosméticos y farmacéuticos, puede usarse en recubrimientos, pinturas y detergentes, entre otros (Zhou y col., 2008). Además, puede emplearse como co-solvente para abaratar el medio de reacción en la deshidratación de fructosa a 5-hidroximetilfurfural (Benoit y col., 2010). El carbonato de glicerina se puede sintetizar a partir de glicerol mediante diversas rutas, entre las que se incluyen: fosfogenación, adición de monóxido o dióxido de carbono, glicerolisis de urea y transesterificación de glicerina con carbonatos orgánicos, esta última de gran interés por transcurrir en fase líquida y a temperaturas moderadas (Esteban y col., 2014).

1.4.7 Gasificación

La gasificación del glicerol se lleva a cabo a través de un proceso termoquímico en fase acuosa utilizando catalizadores de platino y una temperatura de 225-300 °C, generando una mezcla de hidrógeno y monóxido de carbono, conocida como gas de síntesis. Este gas de síntesis es fundamental para el futuro de las biorrefinerías porque puede ser transformado en metanol usando catalizadores de cobre o zinc, cerrando el ciclo del

biodiésel, ya que en la transesterificación se suele emplear metanol como reactivo. Además, el gas de síntesis puede transformarse mediante la reacción de Fischer-Tropsch en hidrocarburos líquidos (Behr y col., 2008).

1.4.8 Biocatálisis

La biocatálisis, ruta biotecnológica o biotransformación consiste en el empleo de microorganismos completos o sistemas de enzimas aisladas, tanto libres como inmovilizadas, para llevar a cabo reacciones químicas de interés.

En general, los biocatalizadores son más selectivos que los catalizadores convencionales y operan en condiciones más suaves de presión y temperatura, favoreciendo de este modo la economía del proceso a través del ahorro energético. Además, permiten la obtención de compuestos de alto valor añadido en una sola etapa, presentando una ventaja competitiva adicional frente a la síntesis orgánica tradicional, que, en muchos casos, requiere de múltiples reacciones en serie para sintetizar el producto de interés (Wohlgemuth, 2010). Sin embargo, los procesos biotecnológicos transcurren generalmente más lentos que los procesos químicos, si se comparan las velocidades en las muy diferentes condiciones de operación de unos y otros.

Cabe destacar que muchos de los compuestos de alto valor añadido que pueden obtenerse partir de glicerol por vía química (1,3-PD, dihidroxiacetona, hidrógeno, etanol, poliésteres, ácido glicérico etc.), también pueden producirse por vía biotecnológica mediante el uso de microorganismos o enzimas, tal y como muestran los ejemplos recogidos en la Tabla 1.3. Además, como se ha mencionado anteriormente, se puede observar en dicha tabla que las condiciones de operación son más severas en la vía química y, comúnmente, esta alternativa requiere el uso de catalizadores que contienen metales nobles de elevado coste económico. No obstante, la obtención de buenos resultados en términos de productividad y rendimiento podría compensar estos costes económicos. Por ello, es conveniente realizar un estudio exhaustivo sobre la viabilidad técnica, las ventajas y desventajas que ofrece cada ruta, para escoger la vía de síntesis más apropiada en cada caso.

Por otro lado, en la Tabla 1.3 se muestran otros compuestos de interés que pueden ser sintetizados por vía biotecnológica pero que no presentan ruta química de síntesis directa a partir de glicerol.

Tabla 1.3. Ejemplos de productos obtenidos a partir de glicerol por vía biotecnológica y por vía química. Comparativa.

Producto	Vía Biotecnológica				Vía Química			
	Proceso	Biocatalizador	Condiciones de operación típicas	Ref.	Proceso	Catalizador	Condiciones de operación típicas	Ref.
1,3-propanodiol	Microbiano/ Enzimático	<i>Clostridium</i> sp., <i>Klebsiella</i> sp., <i>Rautella planticola</i> / <i>Glicerol deshidrogenasa</i> + <i>1,3-propanodiol-oxidoreductasa</i>	37 °C, 1 atm, anaerobiosis	Pachauri y He (2006); Balassy y col. (2009); Drozdzyńska y col. (2011)	Hidrogenolisis	Ir–ReOx/SiO ₂	120 °C, 79 atm	Nakagawa y col. (2010)
Dihidroxiacetona	Microbiano/ Enzimático	<i>Gluconobacter</i> sp., <i>Acetobacter</i> sp., <i>Acetomonas</i> sp./ <i>Glicerol deshidrogenasa</i>	28-30 °C, 1 atm, aerobiosis	Carr (1961); Flickinger y Perlman (1977a); Yamada y col. (1979)	Oxidación parcial	Au, Pt–Bi, TEMPO	60-80 °C, 1 atm	Hu y col. (2010); Rodrigues y col. (2011); Zheng y col. (2012)
Hidrógeno	Microbiano	<i>Enterobacter</i> sp., <i>Rhodospseudomonas palustris</i> , <i>Klebsiella</i> sp.	anaerobiosis	Sarma y col. (2012)	Gasificación/ Reformado	Ru/Al ₂ O ₃ , Pt, Co, Ni	200-800 °C, 1-240 atm	Pachauri y He (2006); Adhikari y col. (2009); Zorin y col. (2012)
Poliésteres	Enzimático	Lipasa B (<i>Candida Antarctica</i>)	30 °C, 200 rpm	Iglesias y col. (1999)	Polimerización	Dilaurato de dibutilestaño	100-150 °C	Brioude y col. (2007)
Ácido succínico	Microbiano	<i>Anaerobiospirillum succiniciproducens</i> , <i>Basfia succiniciproducens</i> , <i>Mannheimia succiniciproducens</i> , <i>Actinobacillus succinogenes</i>	anaerobiosis	Scholten y col. (2009); Vlysidis y col. (2011)	—	—	—	—
Polihidroxialcanoatos	Microbiano	<i>Burkholderia cepacia</i> , <i>Bacillus sonorensis</i> , <i>Halomonas hydrothermalis</i> , <i>Bacillus thuringiensis</i>	37 °C, aerobiosis	Shrivastav y col. (2010); Kumar y col. (2015)	—	—	—	—
Etanol	Microbiano	<i>Enterobacter aerogenes</i>	anaerobiosis	Sakai y Yagishita (2007)	—	—	—	—
Ácido cítrico	Microbiano	<i>Yarrowia lipolytica</i> N15	28 °C, 800 rpm, aerobiosis	Kamzolova y col. (2011)	—	—	—	—
Lípidos microbianos	Microbiano	<i>Cryptococcus curvatus</i>	28 °C, aerobiosis	Liang y col. (2010)	—	—	—	—
2,3-Butanodiol	Microbiano	<i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>K. oxytoca</i> , <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , <i>Raoultella Terrigena</i> , <i>Raoultella planticola</i>	30-37°C, aerobiosis	Petrov y Petrova (2009); Yang y col. (2013); Ripoll (2016)	—	—	—	—
Ácido glicérico	Microbiano	<i>Gluconobacter oxydans</i> , <i>Gluconobacter frateurii</i> , <i>Acetobacter tropicalis</i>	30°C, aerobiosis	Habe y col. (2009)	Oxidación selectiva	Au/C, Pd/C, Pt/C	30-60 °C, 1-3 am	Carretin y col. (2003); Porta y Prati (2004)

Las aplicaciones de dichos compuestos son diversas. Así, el ácido succínico y los polihidroxialcanoatos (PHA) pueden emplearse en la fabricación de resinas y polímeros biodegradables (Lee y col., 2001; Yano y col., 2004; Canadas y col., 2014). El etanol se usa principalmente como disolvente en la manufactura de barnices y perfumes, como desinfectante y como aditivo en gasolinas, ya que al ser un combustible oxigenado reduce la emisión de partículas y NO_x (Badger, 2002). El ácido cítrico es un buen conservante y antioxidante natural, ampliamente empleado en la elaboración de bebidas, comidas y productos farmacéuticos (Vandenberghe y col., 2017). Por otro lado, los lípidos microbianos son una buena alternativa a los aceites vegetales para la síntesis de biodiésel de tercera generación, libre de consideraciones éticas y con las ventajas enumeradas en la Tabla 1.1. Además, este uso del glicerol cerraría el ciclo del biodiésel en la propia planta de producción, con las ventajas asociadas al autoabastecimiento de materia prima (Uprety y col., 2017). Por último, el 2,3-butanodiol es un compuesto de gran interés industrial porque, además de usarse como anticongelante, aditivo en gasolinas para aumentar el octanaje, en la formulación de perfumes, suavizantes, insecticidas, plásticos y tintas, también constituye un compuesto químico de base (*building block*) para la síntesis de otros compuestos de interés (Ji y col., 2011).

En este apartado, se ha puesto de manifiesto el gran potencial que presenta el glicerol para la síntesis de compuestos de interés industrial y el desarrollo de las biorrefinerías de biomasa. Para contribuir a este propósito, es deseable el desarrollo de procesos a partir de los excedentes de glicerol, económicamente viables, que puedan llegar a explotación industrial y en un futuro, reemplazar a los procesos petroquímicos actuales. No obstante, la revalorización de glicerol debe dirigirse hacia la producción de una amplia variedad de compuestos de alto valor añadido y no solamente a uno, para evitar que se produzca una sobreoferta en el mercado que pueda conducir a la depreciación del producto en cuestión.

En esta Tesis Doctoral se ha escogido la producción de dihidroxiacetona como compuesto de alto valor añadido porque, a pesar de que los usos directos requieren pequeñas cantidades, esta molécula constituye un precursor de muchos otros compuestos de interés en la industria. En el apartado siguiente se van a detallar los usos, así como las vías de obtención de este compuesto a partir de glicerol.

1.5 DIHIDROXIACETONA

La dihidroxiacetona o 1,3-dihidroxi-2-propanona (DHA) es un monosacárido perteneciente al grupo de las cetosas y dentro de éste, al de las triosas. Es el único monosacárido simple que no tiene carbonos asimétricos, por lo que no presenta actividad óptica. No obstante, al igual que el resto de monosacáridos, contiene un grupo carbonilo intacto (ver estructura en Figura 1.6) que le confiere carácter reductor. Esta propiedad química es determinante para una de sus principales aplicaciones, como agente autobronceador, según el mecanismo de acción que se va a detallar en el siguiente apartado.

Por otro lado, la DHA se presenta en forma de polvo higroscópico cristalino de color blanco y presenta un sabor dulce y un olor característico. Sus principales propiedades físicas se muestran en la Tabla 1.4.

Tabla 1.4. *Propiedades físicas de la dihidroxiacetona a 20 °C y presión atmosférica (Angerer y col., 2010).*

Propiedades físicas	Valor
Fórmula molecular	$C_3H_6O_3$
Peso molecular (g/mol)	90,08
Punto de fusión (°C)	96,5
Punto de descomposición (°C)	188
Solubilidad en agua (g/L)	>930
Tensión superficial (mN/m)	68,9

1.5.1 Aplicaciones

La DHA es un compuesto muy utilizado en la industria farmacéutica y cosmética, siendo su principal uso directo la formulación de cremas autobronceadoras, donde actúa como principio activo. Debido a su carácter reductor, es capaz de reaccionar con los grupos amino libres de los aminoácidos de las proteínas de la capa córnea de la piel, mediante una reacción de glicosilación no enzimática (reacción de Maillard) que produce unos pigmentos conocidos como melanoidinas coloreados en tonos marrones (Figura 1.7). De este modo, la DHA proporciona un bronceado natural de la piel, sin necesidad de exposición solar, evitándose daños asociados a la exposición prolongada a

los rayos UV, tales como mutagénesis, carcinogénesis, alteraciones inmunológicas y fotoenvejecimiento (Nguyen y Kochevar, 2003). Además, cabe destacar que la DHA sólo interacciona con la capa más superficial de la piel debido a la rapidez con la que se produce la reacción con los aminoácidos, no produciéndose su penetración en las capas más profundas y garantizándose, por tanto, su inocuidad (Kurz, 1994).

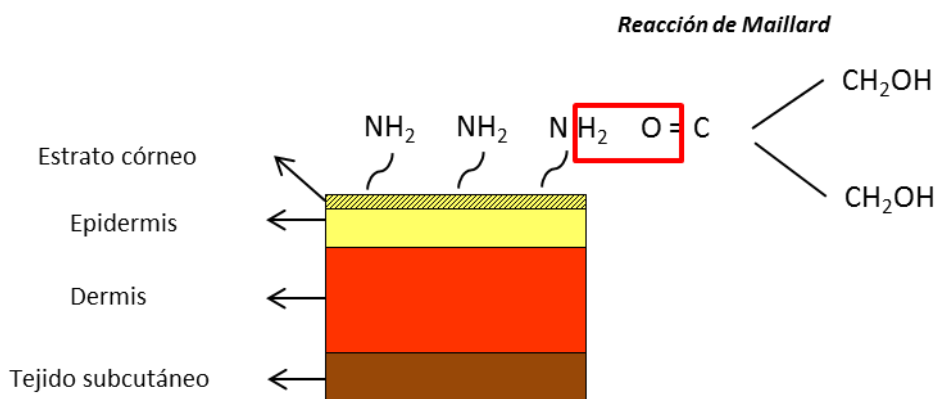


Figura 1.7. Mecanismo de acción de la DHA sobre el estrato córneo de la piel para producir el bronceado artificial.

El tono de piel obtenido tras la aplicación del autobronceador depende de varios factores, entre los que se encuentran: la concentración de DHA, el contenido en agua, el pH y el espesor de la capa córnea de la piel. Una alta concentración de DHA en la loción conduce a una tonalidad más oscura, y viceversa. Sin embargo, el agua inhibe la reacción de Maillard, por lo que la formulación debe hacerse en base aceite. En cuanto al pH, entornos alcalinos generan una tonalidad anaranjada, mientras que entornos ácidos, valor de pH entre 5 y 6, originan una tonalidad rosácea, más natural, por lo que los productores de estas lociones suelen hacer las formulaciones en este intervalo de pH. Por último, cuanto mayor es el espesor de la capa córnea de la piel, más profunda es la pigmentación y más intenso el bronceado obtenido. Por ello, el bronceado es menos intenso en la cara y más intenso en rodillas y codos, donde la capa córnea es más profunda. No obstante, la tonalidad se puede armonizar aplicando distinta cantidad de producto según el espesor de la capa córnea. En cuanto a la duración del bronceado, puede durar un máximo de 14 días, que es lo que tarda el cuerpo en eliminar completamente las células muertas de la capa córnea por descamación natural, aunque este proceso se puede acelerar mediante exfoliación artificial (Draelos, 2016).

Además de ser muy demandadas para broncear la piel por razones estéticas, las lociones que contienen DHA han demostrado una gran eficacia en camuflar zonas despigmentadas de la piel. Por este motivo, suponen una buena alternativa para el tratamiento del vitíligo, enfermedad degenerativa de la piel en la que los melanocitos mueren, dejando de producir melanina y causando zonas despigmentadas en la piel (Fesq y col., 2001; Rajatanavin y col., 2008). Adicionalmente, algunos estudios han descubierto que la DHA constituye un antídoto eficaz frente a la intoxicación por cianuro (Niknahad y O'Brien, 1996). Asimismo, puede mejorar la protección solar, administrada unos días antes de la exposición al sol, en combinación con las cremas protectoras aplicadas en torno a 30 minutos antes de la exposición solar (Draelos, 2016). Además, la DHA es un buen suplemento nutricional para incrementar la masa muscular (Stanko y col., 1990).

Por otro lado, la DHA presenta isomería ceto-enólica, siendo un isómero funcional del gliceraldehído (ver Figura 1.8). Esta peculiaridad, hace de la DHA un excelente y versátil precursor o *building block* para la síntesis orgánica de numerosos compuestos a través de reacciones aldólicas estereoselectivas, que consisten en la adición nucleofílica del enolato de una cetona a un aldehído para formar una unidad estructural (β -hidroxicetona o aldol) que se encuentra en diversos fármacos (Enders y col., 2005).

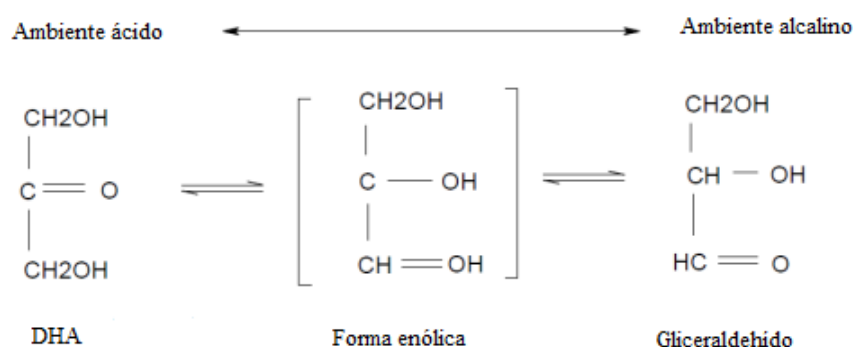


Figura 1.8. Isomería funcional de la DHA en función de la acidez del medio (Katryniok y col., 2011).

En la Figura 1.9 se muestran algunos de los compuestos derivados de la DHA. Entre ellos, destaca el metotrexato, por ser un fármaco históricamente empleado en el tratamiento de diversos tipos de cáncer: pulmón, útero, senos, cuello, cabeza, linfoma y leucemia (Bertino y col., 1973; Cohen y col., 1986). Este medicamento actúa retardando el crecimiento de las células cancerosas y cutáneas, evitando la descamación. Además,

disminuye la actividad del sistema inmunitario. Por ello, es útil tanto en el tratamiento de psoriasis grave (Roenigk y col., 1998) y enfermedades autoinmunes, como artritis reumatoide (Kremer, 1995).

Además, la DHA puede emplearse como monómero para sintetizar un polímero (policarbonato de dihidroxiacetona, p-DHA) biocompatible, no tóxico y biodegradable con excelentes propiedades mecánicas (Zelikin y col., 2006). Este hallazgo ha permitido desarrollar un hidrogel tixotrópico compuesto por polietilenglicol y policarbonato de dihidroxiacetona (MPEG-pDHA) que puede actuar como adhesivo de unión del tejido, evitando que las cavidades postquirúrgicas se llenen de seroma (mezcla de grasa líquida, suero y linfa), problema frecuente tras operaciones de cirugía estética o resección de tumores (Zawaneh y col., 2010).

Por todo lo expuesto anteriormente, la DHA es un compuesto de alto valor añadido y, por tanto, de interés para llevar a cabo la revalorización del glicerol crudo procedente de la manufactura de biodiésel. Las vías de obtención de este compuesto a partir de glicerol (Tabla 1.3) se van a analizar más detalladamente en el siguiente apartado.

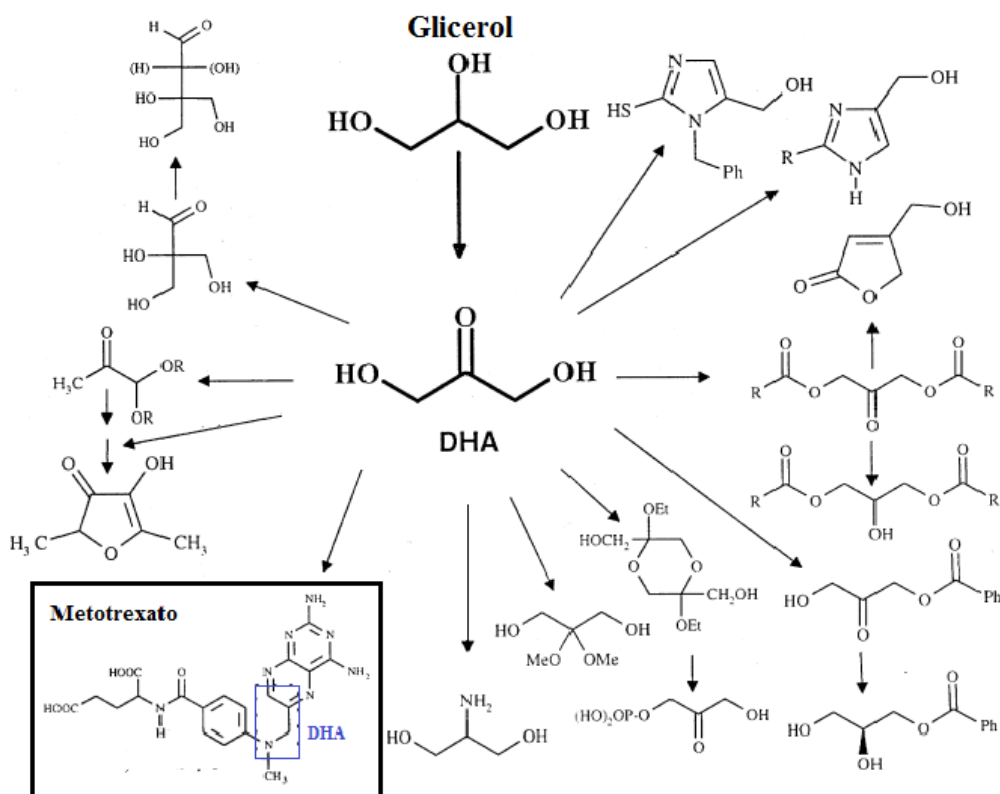


Figura 1.9. Ejemplos de productos derivados de la DHA (figura adaptada de Hekmat y col. (2003)).

1.5.2 Obtención: vía química vs vía biotecnológica

La revalorización del glicerol a DHA por vía química consiste en llevar a cabo una reacción de oxidación parcial selectiva del glicerol en presencia de catalizador y agente oxidante. Sin embargo, dado que los tres grupos hidroxilo del glicerol son susceptibles de oxidación, los productos de reacción obtenidos pueden ser muy diversos, según se muestra en la Figura 1.10. Por ello, el principal reto al que se enfrenta la vía química de revalorización de glicerol a DHA es el desarrollo de catalizadores altamente quimioselectivos para conseguir la oxidación exclusiva del grupo hidroxilo del carbono central y evitar la producción de otros compuestos, que dificultan y encarecen el aislamiento y purificación del compuesto de interés (Liu y col., 2014).

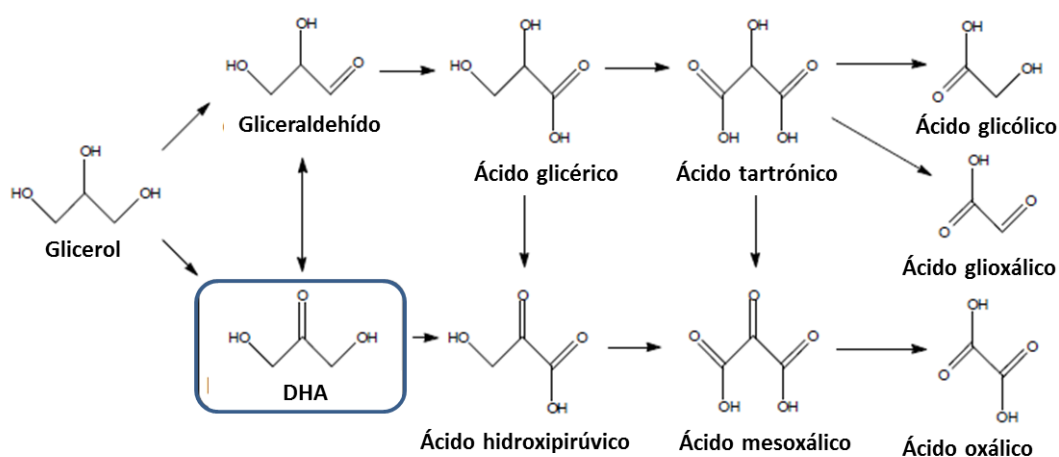


Figura 1.10. Red de productos obtenidos por oxidación parcial de glicerol. Figura adaptada de Hu y col. (2016).

Los catalizadores basados en Pt son más selectivos hacia la oxidación de alcoholes primarios que secundarios, pero la selectividad hacia la oxidación de los alcoholes secundarios se puede mejorar combinándolos con metales pesados del grupo IV, como por ejemplo: C, Pb y Bi (García y col., 1995). Además de la selectividad, la adición de un segundo metal a los catalizadores de Pt y Pd mejora también la actividad y la estabilidad (Demirel-Gülen y col., 2005). Por ejemplo, la selectividad a DHA del catalizador Au/C puede incrementarse del 26 % al 36 % cuando se le incorpora Pt (Au-Pt/C) (Demirel y col., 2007). No obstante, los rendimientos hallados en literatura con este tipo de catalizadores no superan el 40 %. Otra desventaja de los catalizadores con metales del grupo del Pt es que sufren desactivación con el tiempo de reacción por

envenenamiento con oxígeno, siendo preferible el uso de catalizadores basados en partículas de oro por ser más resistentes (Rodrigues y col., 2011).

Por otro lado, la elección de un soporte adecuado parece ser fundamental para modificar la distribución de productos y mejorar la selectividad hacia el producto buscado. Así, la actividad de los catalizadores basados en nanopartículas de oro se ha mejorado considerablemente introduciendo un soporte formado por óxidos metálicos. Con dicho soporte se obtienen rendimientos cercanos al 80 % (Liu y col., 2014), aunque con conversiones de glicerol muy bajas (20 %). Estos datos demuestran la dificultad de obtener altos rendimientos a DHA para conversiones de glicerol elevadas. Esto se debe a que al aumentar el tiempo de reacción (para conseguir una conversión de glicerol alta) se favorece la sobre-oxidación del glicerol y, por tanto, la formación de otros compuestos distintos al de interés (Ciriminna y col., 2006).

No obstante, el empleo de nanotubos de carbono de pared múltiple (MWCNT) como soporte conduce a buenos resultados en términos de conversión (93 %) y rendimiento (60 %) probablemente debido a que su estructura mesoporosa favorece la unión del glicerol con las partículas de oro en una configuración adecuada para que se produzca la oxidación del grupo hidroxilo secundario y/o el desplazamiento del equilibrio de gliceraldehído a DHA (Rodrigues y col., 2011).

Otro procedimiento descrito en bibliografía para la obtención de DHA a partir de glicerol es la oxidación electro-catalítica que consiste en la aplicación de un pequeño potencial eléctrico a una disolución de glicerol en presencia del catalizador TEMPO (tetrametilpiridil-N-oxil). Este proceso es sencillo, no genera residuos y el catalizador puede recuperarse fácilmente mediante extracción líquido-líquido para ser reutilizado (Ciriminna y col., 2006). Sin embargo, la prolongación del tiempo de reacción conduce a la formación de ácido hidroxipirúvico (ver Figura 1.10), obteniéndose rendimientos bajos.

Una manera eficaz de evitar la sobre-oxidación del glicerol consiste en realizar el proceso de producción de DHA en tres etapas según la propuesta de Zheng y col. (2012), tal y como se muestra en el esquema de reacción de la Figura 1.11: una primera en la que se protegen los grupos hidroxilo terminales de la oxidación mediante acetalización del glicerol con benzaldehído, obteniéndose benzaldehído gliceroacetal (5-hidroxi-2-fenil-1,3-dioxano) y 2-fenil-4-hidroximetil-1,3-dioxalano en equilibrio con el

anterior, siendo este último reutilizado en el siguiente ciclo para desplazar el equilibrio hacia la formación de benzaldehído gliceroacetal; una segunda etapa en la que se lleva a cabo la oxidación selectiva del benzaldehído gliceroacetal a 2-fenil-1,3-dioxan-5-ona con un rendimiento del 96 %; y una tercera etapa final en la que se obtiene DHA por deshidratación.

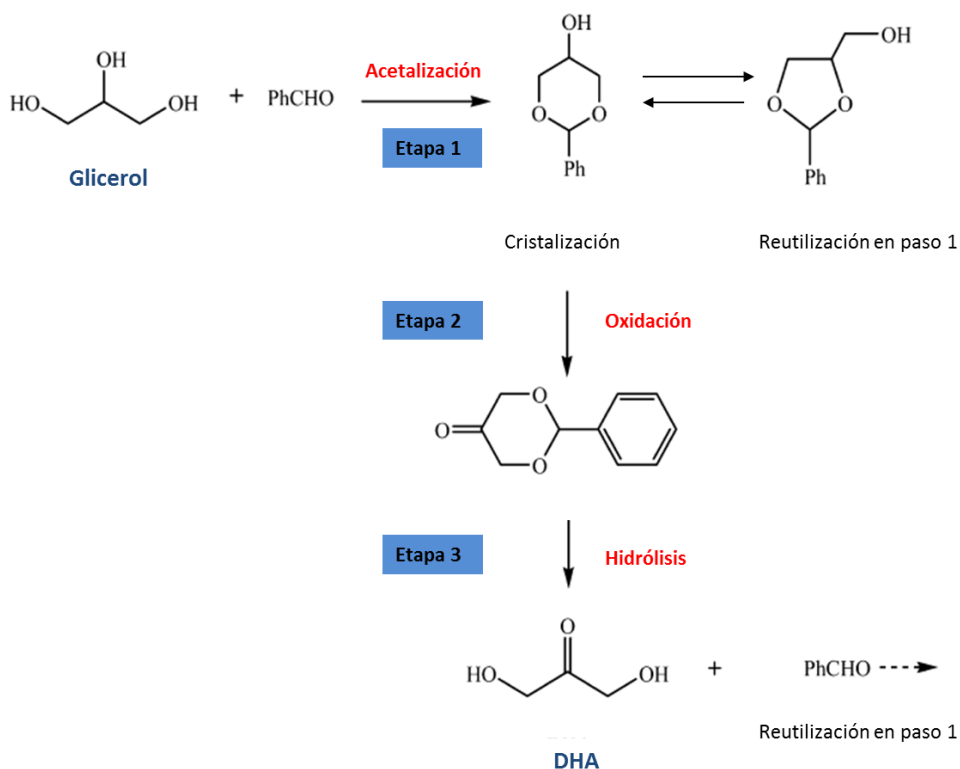


Figura 1.11. Conversión de glicerol a DHA en tres etapas. Figura adaptada de Zheng y col. (2012).

En general, los estudios mencionados anteriormente se han realizado en fase líquida. Otra alternativa explorada ha sido llevar a cabo la reacción en fase gas para evitar el impacto negativo de la fase acuosa sobre los centros activos y mejorar la productividad. Para ello, Lari y col. (2015) escogieron un catalizador basado en zeolitas con hierro (Fe/silicalita) por los buenos resultados publicados en otros estudios de oxidación (Wang y Davis, 1999; Bulánek y col., 2004). Con esta tecnología, que implica altas temperaturas para que el glicerol se encuentre en fase gas, se obtienen conversiones completas y buenos rendimientos (88 %).

En la Tabla 1.5 se muestra un resumen de los resultados más relevantes hallados en bibliografía para la ruta química de revalorización de glicerol a DHA, incluyendo la

conversión de glicerol, el rendimiento a DHA y la productividad volumétrica, definidos por las ecuaciones [3.6], [3.3] y [3.4], respectivamente (ver capítulo 3 de esta Memoria). De entre todas las posibilidades expuestas en la Tabla 1.5, destaca el proceso en tres etapas propuesto por Zheng y col. (2012) porque combina buenos resultados de conversión de glicerol y rendimiento a DHA con los mejores resultados en términos de productividad volumétrica en comparación con los demás procesos. No obstante, en los estudios de Painter y col. (2010) y Lari y col. (2015) también se alcanzan buenos resultados de conversión de glicerol y rendimiento a DHA de manera simultánea, superando uno de los principales retos de esta vía de revalorización de glicerol.

Tabla 1.5. Ruta de revalorización química de glicerol a DHA: condiciones de operación y resultados de los estudios consultados en bibliografía.

Nº Etapas/ Reacción	Catalizador	Agente oxidante	P (atm)	T (°C)	X_{Glic} (%)	$Y_{P/S}$ (%)	P_V (g _{DHA} /L·h)	Ref.
1/oxidación	Pt-Bi/C	Aire	1	60	60	30	24	Garcia y col. (1995)
1/oxidación electrocatalítica	TEMPO	1,1 V (Ag/AgCl)	1	25	-	25	0,06	Ciriminna y col. (2006)
1/oxidación	Pt-Au/C	O ₂	1	60	50	36	33	Demirel y col. (2007)
1/oxidación	Pd en acetronitrilo/ agua	Benzoquinona	1	23	97	92	2,9	Painter y col. (2010)
1/oxidación	Pt-Bi/C	O ₂	3	80	80	48	11	Hu y col. (2010)
1/oxidación	Au/MWCNT	O ₂	3	60	93	60	5,4	Rodrigues y col. (2011)
1/oxidación	Pt-Bi/C	O ₂	1	60	91,5	45	7,5	Liang y col. (2011)
3/acetalización, oxidación e hidrólisis	TEMPO/ NaBr	NaClO	1	16-80	95	95,3	68	Zheng y col. (2012)
1/oxidación	Au/CuO	O ₂	9,8	80	21	83	39	Liu y col. (2014)
1/oxidación (fase gas)	Fe/Silicalita	O ₂	1	350	99	88	-	Lari y col. (2015)

En cuanto a la ruta de revalorización biotecnológica, la principal diferencia con la síntesis química radica en la naturaleza del catalizador, que, tal y como se ha indicado previamente en el apartado 1.4.8, está conformado por microorganismos o enzimas procedentes de los mismos, responsables de llevar a cabo la transformación de glicerol a DHA.

En la Tabla 1.6 se muestra una relación de los microorganismos citados en bibliografía capaces de realizar dicha biotransformación. Cabe destacar que los microorganismos más empleados son bacterias acéticas, no patógenas. Estas bacterias son aerobias estrictas y presentan la capacidad de oxidar parcialmente numerosos sustratos usando el oxígeno como aceptor final de electrones; entre ellos, el etanol a ácido acético, compuesto del que reciben su nombre, por acción de las enzimas *alcohol deshidrogenasa* (ADH) y *aldehído deshidrogenasa* (ALDH), secuencialmente, tal y como muestra la Figura 1.12 (Guillamón y Mas, 2011). No obstante, cuando el sustrato es glicerol se obtiene como producto principal DHA, por mediación de la enzima *glicerol deshidrogenasa* (GDH), según la reacción que se muestra en la Figura 1.13 (Stasiak y Blazejak, 2009).

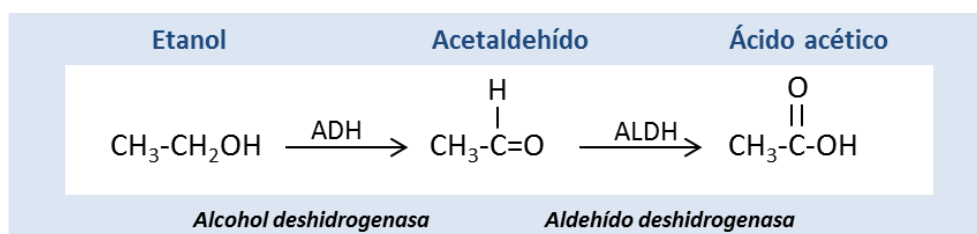


Figura 1.12. Reacción de oxidación parcial del etanol a ácido acético en bacterias acéticas.

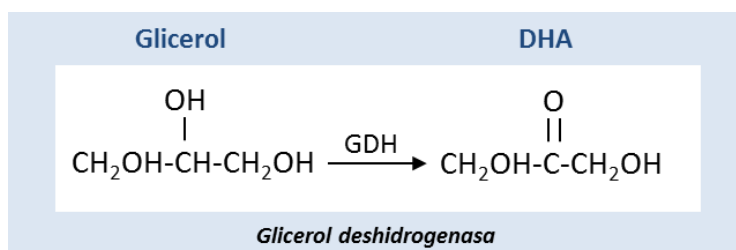


Figura 1.13. Reacción de oxidación parcial de glicerol a dihidroxiacetona en bacterias acéticas.

Todas las bacterias acéticas presentan conversiones de glicerol completas para concentraciones iniciales de hasta 140 g/L, con rendimientos que superan el 70 % en todos los casos. Sin embargo, comparando la productividad, se observa que la especie *Gluconobacter oxydans* es la mejor posicionada en la Tabla 1.6, presentando valores de 3,7 g_{DHA}/L·h la cepa nativa. Además, esta especie presenta un potencial de mejora prometedor como demuestran los resultados obtenidos con la cepa *G. oxydans* M5AM/GDH (productividad casi 2,6 veces superior a la de la cepa nativa), mejorada genéticamente a través de la sobreexpresión de la enzima glicerol deshidrogenasa y de la interrupción del gen que codifica la enzima alcohol deshidrogenasa, principal responsable de la producción de subproductos (Li y col., 2010).

Por otro lado, comparando los resultados de revalorización de glicerol a DHA obtenidos por vía química (Tabla 1.5) y por vía biotecnológica (Tabla 1.6), se observa que, si bien la vía biotecnológica presenta conversiones y rendimientos mucho más altos, los valores de productividad son más bajos en general. Sin embargo, atendiendo a las condiciones de operación, la vía química requiere condiciones mucho más severas, sobre todo de temperatura, el uso de catalizadores caros y compuestos químicos contaminantes y peligrosos, como por ejemplo el benzaldehído (Figura 1.11), inflamable y clasificado como altamente tóxico (frase H302) o la benzoquinona, tóxica en caso de ingestión (H301), inhalación (H331), irritante cutáneo (H315), ocular (H319), de las vías respiratorias (H335) y muy tóxico para los organismos acuáticos (H400), cuyo manejo supone la implementación de estrictas medidas de seguridad (equipos ATEX específicos para atmósferas explosivas, equipos de protección individual, EPI, homologados contra agresiones químicas, gestión de residuos peligrosos, etc.) con el consiguiente coste económico y repercusión ambiental.

Una vez descartados los procesos químicos que implican altos consumos energéticos por emplear altas presiones y temperaturas y aquellos que requieren el uso de sustancias tóxicas y peligrosas, los procesos restantes, aunque operan en condiciones suaves de presión y temperatura y presentan productividades algo mayores a las obtenidas por vía biotecnológica, no son competitivos porque los rendimientos a DHA no superan el 60 % y esto supone una gran inversión en el posterior aislamiento y purificación del compuesto de interés (Svitel y Sturdik, 1994; Hu y col., 2011). Por lo tanto, por motivos de economía de proceso, seguridad e impacto ambiental, parece más

indicada la vía biotecnológica para la producción de DHA a partir de glicerol, usando *G.oxydans* como biocatalizador (Hekmat y col., 2003).

Tabla 1.6. Ruta de revalorización biotecnológica de glicerol a DHA: condiciones de operación y resultados de los estudios consultados en bibliografía.

Biocatalizador	Tipo de cepa	Agente oxidante	P (atm)	T (°C)	X_{Glic} (%)	$Y_{P/S}$ (%)	P_V (g _{DHA} /L·h)	Ref.
<i>Gluconobacter melanogenus</i>	Bacteria acética	Aire enriquecido en O ₂	1	30	99	102	3,09	Flickinger y Perlman (1977b)
<i>Acetobacter xylinum</i>	Bacteria acética	Aire	1	30	99	98	1,13	Nabe y col. (1979)
<i>Gluconobacter oxydans</i>	Bacteria acética	Aire	1	30	-	85	3,70	Hekmat y col. (2003)
<i>Pichia membranifaciens</i>	Levadura	Aire	1	30	86	34	0,28	Liu y col. (2008)
<i>Gluconobacter oxydans</i> M5AM/GDH*	Bacteria acética	Aire	1	30	99	96	9,60	Li y col. (2010)
<i>Kozakia baliensis</i>	Bacteria acética	Aire	1	30	99	73	0,76	Phuangnui y col. (2012)
<i>Gluconobacter frateurii</i>	Bacteria acética	Aire	1	30	-	91	2,6	Liu y col. (2013)

* Cepa mutante

1.6 ETAPAS CLÁSICAS DEL DESARROLLO DE BIOPROCESOS

El desarrollo de un proceso biotecnológico o bioproceso requiere en primera instancia de una comprensión profunda del proceso en cuestión para poder definir las condiciones más favorables y llevar a cabo la producción del compuesto buscado de una manera óptima. Los estudios necesarios para adquirir los conocimientos suficientes con respecto al comportamiento del microorganismo se suelen realizar a escala de laboratorio, siendo necesarios, en segunda instancia, estudios de cambio de escala encaminados a reproducir las condiciones óptimas determinadas en el laboratorio a mayor escala, piloto o industrial. Cabe destacar que cuanto mayor sea el conocimiento sobre el proceso de

biotransformación, más robusto, predecible y reproducible será el bioproceso (Heinzle y col., 2007).

Un bioproceso se puede dividir en diversas etapas. Una posibilidad es considerar dos fases, una primera referente a la obtención del producto o *upstream* y una segunda de asilamiento y purificación del mismo o *downstream* (Atanu Kumar y col., 2011).

La fase de *upstream* se puede dividir a su vez en varias etapas, como muestra la Figura 1.14, aunque se pueden incluir otras, como la preparación de las materias primas, nutrientes o sustratos, la esterilización, etc.

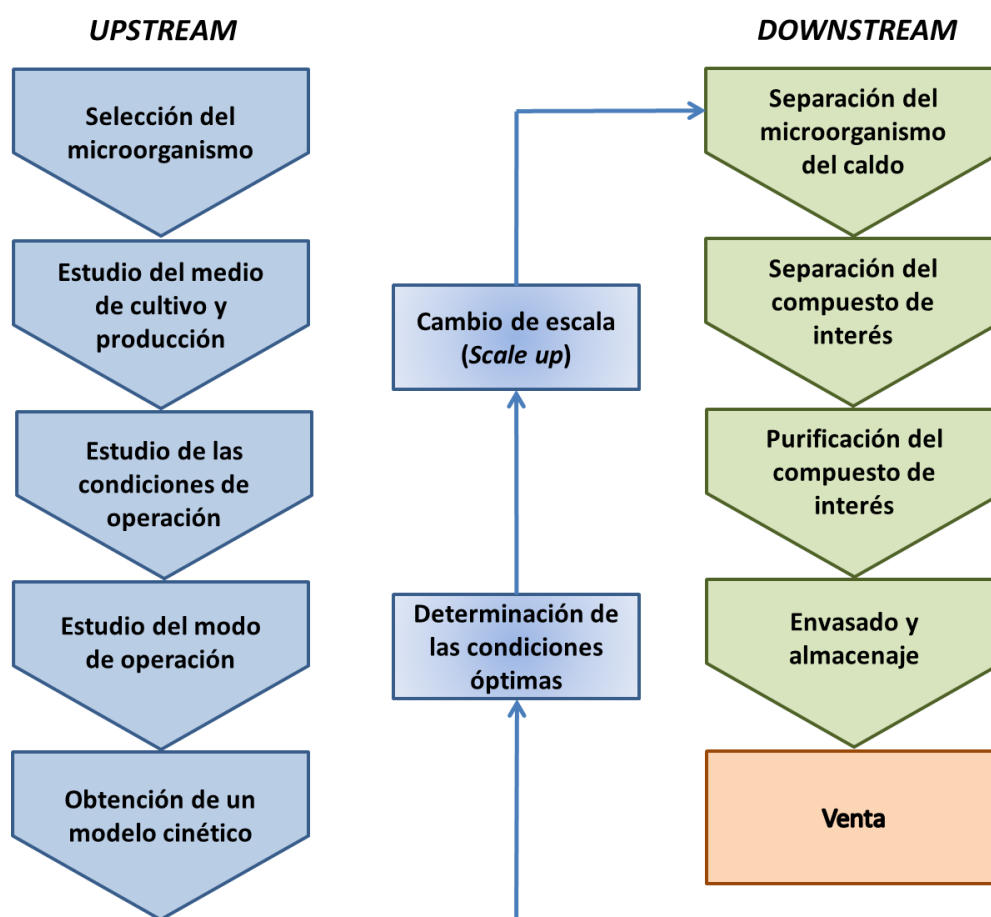


Figura 1.14. Etapas generales para el desarrollo de un bioproceso tanto en la fase de *upstream* como en la de *downstream*.

La selección del microorganismo más adecuado para realizar la producción es fundamental y puede basarse en datos bibliográficos de microorganismos conocidos,

como en este caso, o en experimentos de aislamiento y selección de cepas naturales (*screening*) diseñados para identificar aquellas que son capaces de producir el compuesto de interés, aunque este método consume más tiempo y esfuerzo. Asimismo, es imprescindible el establecimiento de un entorno favorable para que el microorganismo pueda llevar a cabo su función. Para ello, se requiere el estudio de la composición del medio de cultivo con el fin de obtener una cantidad de biocatalizador adecuada y el estudio del medio de producción para dirigir el metabolismo hacia la producción del metabolito deseado. Aunque, en el caso de que la producción esté asociada al crecimiento, únicamente se requiere la definición del medio de cultivo. Del mismo modo, la búsqueda de las condiciones de operación y el modo de operación más apropiados responde a la necesidad de crear un entorno adecuado para la producción.

Por otro lado, la obtención de un modelo cinético a partir de la información recopilada en los distintos estudios es de gran utilidad, tanto para simular el comportamiento del proceso y determinar las condiciones óptimas de producción, como para facilitar la elección y dimensionado del biorreactor y el cambio de escala.

Finalmente, la fase de *downstream* contempla varias etapas encaminadas a la obtención del compuesto de interés con un grado de pureza determinado y un formato apto para su venta (disolución, polvo, crema etc.). Estas especificaciones van a depender fundamentalmente del uso posterior del compuesto, como intermedio o como producto final. En cualquier caso, dichas etapas incluyen la eliminación del microorganismo (ya sea por filtración o centrifugación), la separación del compuesto de interés, si hubiera algún otro compuesto en el caldo de reacción (dependiendo de la naturaleza del compuesto: precipitación, extracción líquido-líquido, arrastre por vapor, intercambio iónico, uso de membranas, etc.) y la purificación del compuesto para obtener el producto comercial (mediante cristalización, empleo de membranas, técnicas cromatográficas o de diálisis etc.).

1.7 OBJETO Y ALCANCE DEL TRABAJO

Este trabajo se enmarca dentro de la estrategia energética imperante a nivel europeo, orientada a impulsar procesos basados en recursos renovables con el fin de no depender de terceros países para satisfacer las necesidades energéticas y reducir las emisiones que

contribuyen al cambio climático, basada en una apuesta fuerte por el biodiésel. En este contexto, la presente Tesis Doctoral surge para dar respuesta al problema emergente del excedente de glicerol generado como consecuencia del incremento de la producción de biodiésel. Para ello, se propone el desarrollo de un bioproceso con el objeto de revalorizar dicho glicerol, en este caso para obtener DHA, un compuesto de alto valor añadido. De esta forma, al evitar la generación de glicerol, que hoy en día se considera un residuo industrial por la sobresaturación del mercado, se puede hacer más competitivo el proceso de producción de biodiésel y más sostenible ambientalmente.

No obstante, dado que el desarrollo completo de un bioproceso desde sus inicios hasta su implementación a nivel industrial es inabarcable en una Tesis Doctoral, se ha definido como objeto específico de este trabajo el estudio en profundidad de la fase de *upstream* para generar conocimiento acerca del proceso de biotransformación de glicerol en DHA con *G. oxydans* y contribuir al futuro desarrollo de un bioproceso eficiente, robusto, predecible y reproducible.

Para alcanzar el objetivo propuesto, se requiere, en primer lugar, la realización de un trabajo previo para desarrollar los métodos de análisis y los procedimientos experimentales más adecuados para trabajar con *G. oxydans* en el proceso de producción de DHA y, con ello, establecer protocolos de trabajo que aseguren la reproducibilidad experimental. A continuación, y siguiendo los pasos detallados en la Figura 1.14, es necesario llevar a cabo el estudio del medio de cultivo y de producción, incluyendo su composición, la caracterización de los efectos inhibitorios (por sustrato y por producto) y la sustitución de glicerol puro por crudo (residuo de la fabricación de biodiésel) para comprobar la factibilidad del proceso. Asimismo, se requiere el estudio de las principales condiciones de operación, como temperatura, pH, velocidad de agitación y porcentaje de inóculo en el caldo de cultivo. Por otro lado, en cuanto al modo de operación, es interesante explorar la producción con células en estado de reposo (*resting cells*) por las ventajas operativas que presenta, así como estudiar la posibilidad de trabajar con células inmovilizadas para facilitar la etapa posterior de *downstream* y permitir la reutilización del biocatalizador. Finalmente, es imprescindible caracterizar el sistema mediante la modelización cinética del proceso para poder predecir su comportamiento a través de ecuaciones. Todos estos puntos constituyen el alcance del trabajo y van a ser desarrollados a lo largo de los siguientes Capítulos.

1.8 BIBLIOGRAFÍA

- Adhikari, S., Fernando, S.D., Haryanto, A. 2009. Hydrogen production from glycerol: An update. *Energy Conversion and Management*, **50**(10), 2600-2604.
- Agarwal, A.K. 2007. Biofuels (alcohols and biodiesel) applications as fuels for internal combustion engines. *Progress in Energy and Combustion Science*, **33**(3), 233-271.
- Amaral, P.F.F., Ferreira, T.F., Fontes, G.C., Coelho, M.A.Z. 2009. Glycerol valorization: New biotechnological routes. *Food and Bioproducts Processing*, **87**(3), 179-186.
- Angerer, J., Bernauer, U., Cham, C., Chaudhry, Q., Degen, G., Platzek, T., Rastogi, S.C., Rogier, V., Rousselle, C., Sanner, T., Savolainen, K., Van Engelen, J., Vinardell, M.P., Waring, R., White, I. 2010. Opinion on dihydroxyacetone. *Scientific Committee on Consumer Safety*, European Union.
- Asif, M., Muneer, T. 2007. Energy supply, its demand and security issues for developed and emerging economies. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **11**(7), 1388-1413.
- Atanu Kumar, J., Mahalakshmi, D.K., Sridhari, G. 2011. Integrated application of bioprocess engineering and biotechniques for quality & bulk drug manufacturing. *Journal of Bioequivalence & Bioavailability*, **3**, 277-285.
- Ayoub, M., Abdullah, A.Z. 2012. Critical review on the current scenario and significance of crude glycerol resulting from biodiesel industry towards more sustainable renewable energy industry. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **16**(5), 2671-2686.
- Badger, P. 2002. Ethanol from cellulose: A general review. *Trends in new crops and new uses*, **1**, 17-21.
- Balassy, A., Németh, Á., Sevela, B. 2009. Immobilized enzymes availability for glycerol-1, 3 propanediol bioconversion. *Hungarian Journal of Industry and Chemistry*, **37**(2).

- Behr, A., Eilting, J., Irawadi, K., Leschinski, J., Lindner, F. 2008. Improved utilisation of renewable resources: New important derivatives of glycerol. *Green Chemistry*, **10**(1), 13-30.
- Benoit, M., Brissonnet, Y., Guélou, E., De Oliveira Vigier, K., Barrault, J., Jérôme, F. 2010. Acid-catalyzed dehydration of fructose and inulin with glycerol or glycerol carbonate as renewably sourced co-solvent. *ChemSusChem*, **3**(11), 1304-1309.
- Bertino, J.R., Mosher, M.B., Deconti, R.C. 1973. Chemotherapy of cancer of the head and neck. *Cancer*, **31**(5), 1141-1149.
- Bozell, J.J., Petersen, G.R. 2010. Technology development for the production of biobased products from biorefinery carbohydrates—the us department of energy’s “top 10” revisited. *Green Chemistry*, **12**(4), 539-554.
- Glycerol esters as fuel economy additives Brewster, P.W., Smith, C.R., Gowland, F.W. 1987. Glycerol esters as fuel economy additives, Google Patents.
- Brioude, M.d.M., Guimarães, D.H., Fiúza, R.d.P., Prado, L.A.S.d.A., Boaventura, J.S., José, N.M. 2007. Synthesis and characterization of aliphatic polyesters from glycerol, by-product of biodiesel production, and adipic acid. *Materials Research*, **10**(4), 335-339.
- Bulánek, R., Wichterlová, B., Novoveská, K., Kreibich, V. 2004. Oxidation of propane with oxygen and/or nitrous oxide over fe-zsm-5 with low iron concentrations. *Applied Catalysis A: General*, **264**(1), 13-22.
- Canadas, R.F., Cavalheiro, J.M., Guerreiro, J.D., de Almeida, M.C.M., Pollet, E., da Silva, C.L., da Fonseca, M., Ferreira, F.C. 2014. Polyhydroxyalkanoates: Waste glycerol upgrade into electrospun fibrous scaffolds for stem cells culture. *International journal of biological macromolecules*, **71**, 131-140.
- Carr, J. 1961. Dihydroxyacetone production in *Acetomonas*. *Nature*, **192**, 683-684.
- Carrettin, S., McMorn, P., Johnston, P., Griffin, K., Kiely, C.J., Hutchings, G.J. 2003. Oxidation of glycerol using supported Pt, Pd and Au catalysts. *Physical Chemistry Chemical Physics*, **5**(6), 1329-1336.

- Ciriminna, R., Palmisano, G., Della Pina, C., Rossi, M., Pagliaro, M. 2006. One-pot electrocatalytic oxidation of glycerol to DHA. *Tetrahedron letters*, **47**(39), 6993-6995.
- Ciriminna, R., Pina, C.D., Rossi, M., Pagliaro, M. 2014. Understanding the glycerol market. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **116**(10), 1432-1439.
- Cohen, I.J., Vogel, R., Matz, S., Weitz, R., Mor, C., Stern, S., Zaizov, R. 1986. Successful non-neurotoxic therapy (without radiation) of a multifocal primary brain lymphoma with a methotrexate, vincristine, and bcnu protocol (demob). *Cancer*, **57**(1), 6-11.
- Chai, S.-H., Wang, H.-P., Liang, Y., Xu, B.-Q. 2007. Sustainable production of acrolein: Investigation of solid acid–base catalysts for gas-phase dehydration of glycerol. *Green Chemistry*, **9**(10), 1130-1136.
- Chai, S.-H., Yan, B., Tao, L.-Z., Liang, Y., Xu, B.-Q. 2014. Sustainable production of acrolein: Catalytic gas-phase dehydration of glycerol over dispersed tungsten oxides on alumina, zirconia and silica. *Catalysis Today*, **234**, 215-222.
- Chaminand, J., aurent Djakovitch, L., Gallezot, P., Marion, P., Pinel, C., Rosier, C. 2004. Glycerol hydrogenolysis on heterogeneous catalysts. *Green Chemistry*, **6**(8), 359-361.
- Chester, L. 2010. Conceptualising energy security and making explicit its polysemic nature. *Energy policy*, **38**(2), 887-895.
- Demirbas, A. 2009. Political, economic and environmental impacts of biofuels: A review. *Applied energy*, **86**, S108-S117.
- Demirel-Gülen, S., Lucas, M., Claus, P. 2005. Liquid phase oxidation of glycerol over carbon supported gold catalysts. *Catalysis Today*, **102**, 166-172.
- Demirel, S., Lehnert, K., Lucas, M., Claus, P. 2007. Use of renewables for the production of chemicals: Glycerol oxidation over carbon supported gold catalysts. *Applied Catalysis B: Environmental*, **70**(1), 637-643.
- Draeos, Z.D. 2016. Photoprotection from sunless tanning products and colored cosmetics. in: *Principles and practice of photoprotection*, Springer, pp. 405-415.

- Drozdzyńska, A., Leja, K., Czaczyk, K. 2011. Biotechnological production of 1,3-propanediol from crude glycerol. *BioTechnologia. Journal of Biotechnology Computational Biology and Bionanotechnology*, **92**(1).
- Enders, D., Voith, M., Lenzen, A. 2005. The dihydroxyacetone unit—a versatile C3 building block in organic synthesis. *Angewandte Chemie International Edition*, **44**(9), 1304-1325.
- Esteban, J., Ladero, M., Molinero, L., García-Ochoa, F. 2014. Liquid–liquid equilibria for the ternary systems dmc–methanol–glycerol, dmc–glycerol carbonate–glycerol and the quaternary system dmc–methanol–glycerol carbonate–glycerol at catalytic reacting temperatures. *Chemical Engineering Research and Design*, **92**(12), 2797-2805.
- Fesq, H., Brockow, K., Strom, K., Mempel, M., Ring, J., Abeck, D. 2001. Dihydroxyacetone in a new formulation—a powerful therapeutic option in vitiligo. *Dermatology*, **203**(3), 241-243.
- Flickinger, M., Perlman, D. 1977a. Application of oxygen-enriched aeration in the conversion of glycerol to dihydroxyacetone by *Gluconobacter melanogenus* IFO 3293. *Applied and environmental microbiology*, **33**(3), 706-712.
- Flickinger, M.C., Perlman, D. 1977b. Application of oxygen-enriched aeration in conversion of glycerol to dihydroxyacetone by *Gluconobacter-melanogenus* IFO-3293. *Applied and Environmental Microbiology*, **33**(3), 706-712.
- Garcia, R., Besson, M., Gallezot, P. 1995. Chemoselective catalytic oxidation of glycerol with air on platinum metals. *Applied Catalysis A: General*, **127**(1–2), 165-176.
- Gu, Y., Jérôme, F. 2010. Glycerol as a sustainable solvent for green chemistry. *Green Chemistry*, **12**(7), 1127-1138.
- Guillamón, J.M., Mas, A. 2011. Chapter 9 - acetic acid bacteria. in: *Molecular wine microbiology*, Academic Press. San Diego, pp. 227-255.

- Habe, H., Fukuoka, T., Kitamoto, D., Sakaki, K. 2009. Biotechnological production of D-glyceric acid and its application. *Applied microbiology and biotechnology*, **84**(3), 445-452.
- Heinzle, E., Biwer, A.P., Cooney, C.L. 2007. Development of sustainable bioprocesses: Modeling and assessment. John Wiley & Sons.
- Hekmat, D., Bauer, R., Fricke, J. 2003. Optimization of the microbial synthesis of dihydroxyacetone from glycerol with *Gluconobacter oxydans*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, **26**(2), 109-116.
- Hu, W., Knight, D., Lowry, B., Varma, A. 2010. Selective oxidation of glycerol to dihydroxyacetone over Pt– Bi/C catalyst: Optimization of catalyst and reaction conditions. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, **49**(21), 10876-10882.
- Hu, W., Lowry, B., Varma, A. 2016. Catalytic oxidation of glycerol to dihydroxyacetone. *21st International Symposium on Chemical Reaction Engineering, ISCRE*.
- Hu, Z.-C., Zheng, Y.-G., Shen, Y.-C. 2011. Use of glycerol for producing 1,3-dihydroxyacetone by *Gluconobacter oxydans* in an airlift bioreactor. *Bioresource Technology*, **102**(14), 7177-7182.
- Iglesias, L.E., Fukuyama, Y., Nonami, H., Erra-Balsells, R., Baldessari, A. 1999. A simple enzymatic procedure for the synthesis of a hydroxylated polyester from glycerol and adipic acid. *Biotechnology techniques*, **13**(12), 923-926.
- Irawadi, K., Leschinski, J., Lindner, F., Eilting, J., Behr, A. 2007. Improved utilisation of renewable resources: New important derivatives of glycerol.
- Janaun, J., Ellis, N. 2010. Perspectives on biodiesel as a sustainable fuel. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **14**(4), 1312-1320.
- Ji, X.-J., Huang, H., Ouyang, P.-K. 2011. Microbial 2,3-butanediol production: A state-of-the-art review. *Biotechnology Advances*, **29**(3), 351-364.
- Johnson, D.T., Taconi, K.A. 2007. The glycerin glut: Options for the value-added conversion of crude glycerol resulting from biodiesel production. *Environmental Progress*, **26**(4), 338-348.

- Kamzolova, S.V., Fatykhova, A.R., Dedyukhina, E.G., Anastassiadis, S.G., Golovchenko, N.P., Morgunov, I.G. 2011. Citric acid production by yeast grown on glycerol-containing waste from biodiesel industry. *Food Technology and Biotechnology*, **49**(1), 65.
- Kansedo, J., Lee, K.T., Bhatia, S. 2009. *Cerbera odollam* (sea mango) oil as a promising non-edible feedstock for biodiesel production. *Fuel*, **88**(6), 1148-1150.
- Katryniok, B., Kimura, H., Skrzyńska, E., Girardon, J.-S., Fongarland, P., Capron, M., Ducoulombier, R., Mimura, N., Paul, S., Dumeignil, F. 2011. Selective catalytic oxidation of glycerol: Perspectives for high value chemicals. *Green Chemistry*, **13**(8), 1960-1979.
- Kenar, J.A. 2007. Glycerol as a platform chemical: Sweet opportunities on the horizon? *Lipid Technology*, **19**(11), 249-253.
- Kremer, J. 1995. Possible mechanisms of action of methotrexate in patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, **34**(suppl 2), 26-29.
- Kumar, P., Ray, S., Patel, S.K., Lee, J.-K., Kalia, V.C. 2015. Bioconversion of crude glycerol to polyhydroxyalkanoate by *Bacillus thuringiensis* under non-limiting nitrogen conditions. *International journal of biological macromolecules*, **78**, 9-16.
- Kurz, T. 1994. Formulating effective self-tanners with DHA. *Cosmetics and toiletries*, **109**(11), 55-61.
- Lari, G.M., Mondelli, C., Pérez-Ramírez, J. 2015. Gas-phase oxidation of glycerol to dihydroxyacetone over tailored iron zeolites. *ACS Catalysis*, **5**(3), 1453-1461.
- Lee, P.C., Lee, W.G., Lee, S.Y., Chang, H.N. 2001. Succinic acid production with reduced by-product formation in the fermentation of *Anaerobiospirillum succiniciproducens* using glycerol as a carbon source. *Biotechnology and Bioengineering*, **72**(1), 41-48.
- Li, M.-h., Wu, J., Liu, X., Lin, J.-p., Wei, D.-z., Chen, H. 2010. Enhanced production of dihydroxyacetone from glycerol by overexpression of glycerol dehydrogenase in an alcohol dehydrogenase-deficient mutant of *Gluconobacter oxydans*. *Bioresource Technology*, **101**(21), 8294-8299.

- Liang, D., Shiyu, C., Jing, G., Junhua, W., Ping, C., Zhaoyin, H. 2011. Glycerol oxidation with oxygen over bimetallic Pt-Bi catalysts under atmospheric pressure. *Chinese Journal of Catalysis*, **32**(11), 1831-1837.
- Liang, Y., Cui, Y., Trushenski, J., Blackburn, J.W. 2010. Converting crude glycerol derived from yellow grease to lipids through yeast fermentation. *Bioresource technology*, **101**(19), 7581-7586.
- Liu, S.-S., Sun, K.-Q., Xu, B.-Q. 2014. Specific selectivity of Au-catalyzed oxidation of glycerol and other C3-polyols in water without the presence of a base. *ACS Catalysis*, **4**(7), 2226-2230.
- Liu, Y.-P., Sun, Y., Tan, C., Li, H., Zheng, X.-J., Jin, K.-Q., Wang, G. 2013. Efficient production of dihydroxyacetone from biodiesel-derived crude glycerol by newly isolated *Gluconobacter frateurii*. *Bioresource Technology*, **142**, 384-389.
- Liu, Z., Hu, Z., Zheng, Y., Shen, Y. 2008. Optimization of cultivation conditions for the production of 1,3-dihydroxyacetone by *Pichia membranifaciens* using response surface methodology. *Biochemical engineering journal*, **38**(3), 285-291.
- Makadia, H.K., Siegel, S.J. 2011. Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. *Polymers*, **3**(3), 1377-1397.
- Marchetti, J., Miguel, V., Errazu, A. 2007. Possible methods for biodiesel production. *Renewable and sustainable energy reviews*, **11**(6), 1300-1311.
- Molinero, L., Ladero, M., Tamayo, J., García-Ochoa, F. 2014. Homogeneous catalytic esterification of glycerol with cinnamic and methoxycinnamic acids to cinnamate glycerides in solventless medium: Kinetic modeling. *Chemical Engineering Journal*, **247**, 174-182.
- Morrison, L.R. 2000. Glycerol. *Kirk-Othmer Encyclopedia of chemical technology*.
- Nabe, K., Izuo, N., Yamada, S., Chibata, I. 1979. Conversion of glycerol to dihydroxyacetone by immobilized whole cells of *Acetobacter-xylinum*. *Applied and Environmental Microbiology*, **38**(6), 1056-1060.

- Nakagawa, Y., Shinmi, Y., Koso, S., Tomishige, K. 2010. Direct hydrogenolysis of glycerol into 1,3-propanediol over rhenium-modified iridium catalyst. *Journal of Catalysis*, **272**(2), 191-194.
- Narasimhan, V., Mani, S., Varghese, J., Manilal, A.M., Fasnabi, P.A. 2016. Process incentives by the intensification of a conventional biodiesel plant. *Procedia Technology*, **24**, 661-668.
- Nguyen, B.C., Kochevar, I. 2003. Factors influencing sunless tanning with dihydroxyacetone. *British Journal of Dermatology*, **149**(2), 332-340.
- Niknahad, H., O'Brien, P.J. 1996. Antidotal effect of dihydroxyacetone against cyanide toxicity in vivo. *Toxicology and applied pharmacology*, **138**(1), 186-191.
- Pachauri, N., He, B. 2006. Value-added utilization of crude glycerol from biodiesel production: A survey of current research activities. *Proceedings of the ASABE annual international meeting*. American Society of Agricultural and Biological Engineers. pp. 1-16.
- Pagliaro, M., Ciriminna, R., Kimura, H., Rossi, M., Della Pina, C. 2007. From glycerol to value-added products. *Angewandte Chemie International Edition*, **46**(24), 4434-4440.
- Painter, R.M., Pearson, D.M., Waymouth, R.M. 2010. Selective catalytic oxidation of glycerol to dihydroxyacetone. *Angewandte Chemie International Edition*, **49**(49), 9456-9459.
- Petrov, K., Petrova, P. 2009. High production of 2,3-butanediol from glycerol by *Klebsiella pneumoniae* G31. *Applied microbiology and biotechnology*, **84**(4), 659-665.
- Phuangnui, J., Moonmangmee, D., Moonmangmee, S., Adachi, O., Matsushita, K. 2012. *Kozakia baliensis*, the new potential acetic acid bacterium uses for dihydroxyacetone production. *1st Mae Fah Luang University International Conference 2012*.

- Porta, F., Prati, L. 2004. Selective oxidation of glycerol to sodium glycerate with gold-on-carbon catalyst: An insight into reaction selectivity. *Journal of Catalysis*, **224**(2), 397-403.
- Puppan, D. 2002. Environmental evaluation of biofuels. *Periodica Polytechnica. Social and Management Sciences*, **10**(1), 95.
- Rajatanavin, N., Suwanachote, S., Kulkollakarn, S. 2008. Dihydroxyacetone: A safe camouflaging option in vitiligo. *International journal of dermatology*, **47**(4), 402-406.
- Ripoll, V. 2016. Producción de 2,3-butanodiol a partir de glicerina. *Tesis Doctoral*, Departamento de Ingeniería Química. Universidad Complutense de Madrid.
- Rodolfi, L., Chini Zittelli, G., Bassi, N., Padovani, G., Biondi, N., Bonini, G., Tredici, M.R. 2009. Microalgae for oil: Strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnology and bioengineering*, **102**(1), 100-112.
- Rodrigues, E.G., Pereira, M.F., Delgado, J.J., Chen, X., Órfão, J.J. 2011. Enhancement of the selectivity to dihydroxyacetone in glycerol oxidation using gold nanoparticles supported on carbon nanotubes. *Catalysis Communications*, **16**(1), 64-69.
- Roenigk, H.H., Auerbach, R., Maibach, H., Weinstein, G., Lebwohl, M. 1998. Methotrexate in psoriasis: Consensus conference. *Journal of the American Academy of Dermatology*, **38**(3), 478-485.
- Sakai, S., Yagishita, T. 2007. Microbial production of hydrogen and ethanol from glycerol-containing wastes discharged from a biodiesel fuel production plant in a bioelectrochemical reactor with thionine. *Biotechnology and bioengineering*, **98**(2), 340-348.
- Sarma, S.J., Brar, S.K., Sydney, E.B., Le Bihan, Y., Buelna, G., Soccol, C.R. 2012. Microbial hydrogen production by bioconversion of crude glycerol: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, **37**(8), 6473-6490.

- Scholten, E., Renz, T., Thomas, J. 2009. Continuous cultivation approach for fermentative succinic acid production from crude glycerol by *Basfia succiniciproducens* DD1. *Biotechnology letters*, **31**(12), 1947.
- Schuchardt, U., Sercheli, R., Vargas, R.M. 1998. Transesterification of vegetable oils: A review. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **9**(3), 199-210.
- Shrivastav, A., Mishra, S.K., Shethia, B., Pancha, I., Jain, D., Mishra, S. 2010. Isolation of promising bacterial strains from soil and marine environment for polyhydroxyalkanoates (phas) production utilizing jatropha biodiesel byproduct. *International Journal of Biological Macromolecules*, **47**(2), 283-287.
- Sorda, G., Banse, M., Kemfert, C. 2010. An overview of biofuel policies across the world. *Energy policy*, **38**(11), 6977-6988.
- Stanko, R., Robertson, R., Spina, R., Reilly, J., Greenawalt, K., Goss, F. 1990. Enhancement of arm exercise endurance capacity with dihydroxyacetone and pyruvate. *Journal of Applied Physiology*, **68**(1), 119-124.
- Stasiak, L., Blazejak, S. 2009. Acetic acid bacteria-perspectives of application in biotechnology-a review. *Polish Journal of Food and Nutrition Sciences*, **59**(1).
- Svitel, J., Sturdik, E. 1994. Product yield and by-product formation in glycerol conversion to dihydroxyacetone by *Gluconobacter oxydans*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **78**(5), 351-355.
- Talebian-Kiakalaieh, A., Amin, N.A.S., Hezaveh, H. 2014. Glycerol for renewable acrolein production by catalytic dehydration. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **40**, 28-59.
- Tan, H., Aziz, A.A., Aroua, M. 2013. Glycerol production and its applications as a raw material: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, **27**, 118-127.
- Upriety, B.K., Dalli, S.S., Rakshit, S.K. 2017. Bioconversion of crude glycerol to microbial lipid using a robust oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* ATCC 10788 capable of growing in the presence of impurities. *Energy Conversion and Management*, **135**, 117-128.

- Vandenberghe, L.P.S., Rodrigues, C., de Carvalho, J.C., Medeiros, A.B.P., Soccol, C.R. 2017. 25 - production and application of citric acid. in: *Current developments in biotechnology and bioengineering*, Elsevier, pp. 557-575.
- Vlysidis, A., Binns, M., Webb, C., Theodoropoulos, C. 2011. Glycerol utilisation for the production of chemicals: Conversion to succinic acid, a combined experimental and computational study. *Biochemical engineering journal*, **58**, 1-11.
- Wang, Y., Davis, B.H. 1999. Fischer–tropsch synthesis. Conversion of alcohols over iron oxide and iron carbide catalysts. *Applied Catalysis A: General*, **180**(1), 277-285.
- Wohlgemuth, R. 2010. Biocatalysis—key to sustainable industrial chemistry. *Current opinion in biotechnology*, **21**(6), 713-724.
- Xin, L., Zhang, Z., Wang, Z., Li, W. 2012. Simultaneous generation of mesoxalic acid and electricity from glycerol on a gold anode catalyst in anion-exchange membrane fuel cells. *ChemCatChem*, **4**(8), 1105-1114.
- Yamada, S., Nabe, K., Izuo, N., Wada, M., Chibata, I. 1979. Studies on aerobic fermentation .4. Fermentative production of dihydroxyacetone by *Acetobacter-suboxydans* ATCC-621. *Journal of Fermentation Technology*, **57**(3), 215-220.
- Yang, T.-W., Rao, Z.-M., Zhang, X., Xu, M.-J., Xu, Z.-H., Yang, S.-T. 2013. Fermentation of biodiesel-derived glycerol by *Bacillus amyloliquefaciens*: Effects of co-substrates on 2,3-butanediol production. *Applied microbiology and biotechnology*, **97**(17), 7651-7658.
- Yano, T., Sugawa, E., Imamura, T., Kenmoku, T. 2004. Binder resin containing polyhydroxyalkanoate, toner containing the binder resin, and image-forming method and image-forming apparatus which make use of the toner, Google Patents.
- Zawaneh, P.N., Singh, S.P., Padera, R.F., Henderson, P.W., Spector, J.A., Putnam, D. 2010. Design of an injectable synthetic and biodegradable surgical biomaterial. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **107**(24), 11014-11019.

- Zelikin, A.N., Zawaneh, P.N., Putnam, D. 2006. A functionalizable biomaterial based on dihydroxyacetone, an intermediate of glucose metabolism. *Biomacromolecules*, **7**(11), 3239-3244.
- Zheng, Z., Luo, M., Yu, J., Wang, J., Ji, J. 2012. Novel process for 1, 3-dihydroxyacetone production from glycerol. 1. Technological feasibility study and process design. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, **51**(9), 3715-3721.
- Zhou, C.-H.C., Beltramini, J.N., Fan, Y.-X., Lu, G.M. 2008. Chemoselective catalytic conversion of glycerol as a biorenewable source to valuable commodity chemicals. *Chemical Society Reviews*, **37**(3), 527-549.
- Zorin, V., Petukhova, N., Shakhmaev, R. 2012. Promising directions for utilization of glycerol-containing waste from biodiesel fuel production. *Russian Journal of General Chemistry*, **82**(5), 1013-1026.

CAPÍTULO 2.

MATERIALES Y MÉTODOS

CAPÍTULO 2.

MATERIALES Y MÉTODOS

Índice

2.1	MATERIALES EMPLEADOS	61
2.1.1	Microorganismo	61
2.1.2	Reactivos	63
2.1.3	Medios de cultivo	65
2.2	EQUIPOS	67
2.2.1	Equipos para trabajar en condiciones de esterilidad	67
2.2.2	Equipos para la conservación y el cultivo de células	67
2.2.3	Equipos de medida y análisis	72
2.2.4	Equipos auxiliares.....	75
2.3	PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES.....	77
2.3.1	Protocolo de esterilización y manipulación	77
2.3.2	Protocolo de conservación del microorganismo	78
2.3.3	Preparación del inóculo	78
2.3.4	Experimentos de producción de DHA.....	79
2.3.5	Medida de la actividad enzimática	81
2.3.6	Conteo de células viables en placa	82
2.3.7	Inmovilización del microorganismo	83
2.4	MÉTODOS DE ANÁLISIS.....	84
2.4.1	Análisis de la biomasa	84
2.4.2	Análisis del sustrato y de los productos.....	86
2.5	MÉTODOS DE ESTIMACIÓN Y DE AJUSTE	91
2.5.1	Estimación de k_{La}	91
2.5.2	Determinación experimental de OTR, k_{La} , OUR y q_{o_2}	95
2.5.3	Modelización cinética del proceso	97
2.6	BIBLIOGRAFÍA.....	100

CAPÍTULO 2.

MATERIALES Y MÉTODOS

La realización del presente trabajo ha requerido tanto del uso de diversos materiales y equipos, como de la puesta a punto de diferentes métodos de análisis y protocolos experimentales para asegurar la reproducibilidad y repetitividad de los experimentos. En este capítulo se describen los materiales y equipos empleados, los procedimientos experimentales y los métodos de análisis desarrollados, además de los métodos numéricos utilizados para interpretar los resultados.

2.1 MATERIALES EMPLEADOS

A continuación se detallan las características principales del microorganismo empleado y de los reactivos utilizados, además de describir la composición de los medios de cultivo seleccionados para llevar a cabo la parte experimental de la presente Tesis Doctoral.

2.1.1 Microorganismo

El microorganismo seleccionado para la realización de este trabajo de investigación ha sido *Gluconobacter oxydans* ATCC 621, suministrado por la Colección Española de Cultivos Tipo (ref. CECT 360). Se trata de una cepa nativa que se encuentra de forma natural en nichos con elevada concentración de azúcares, como ciertas frutas (uvas, manzanas, dátiles, etc.) y en las abejas productoras de miel, aunque también se ha detectado su presencia en suelos y bebidas alcohólicas como la sidra, el vino y la cerveza (Gupta y col., 2001). Aunque este microorganismo no es patógeno ni para el hombre ni para los animales, es el causante de la putrefacción de frutas y del picado acético del vino, alterando sus características organolépticas (Garrity y col., 2006; De Muynck y col., 2007).

La selección de esta cepa ha sido motivada por los buenos resultados previos publicados en bibliografía en términos de rendimiento producto/sustrato y productividad (ver Tabla 1.6) y por las características tan particulares que presenta este microorganismo, que hacen que sea un buen candidato para el desarrollo de procesos

biotecnológicos, como se va a demostrar a continuación a través de una breve descripción de su metabolismo.

G. oxydans es una bacteria acética, Gram negativa y aerobia estricta, cuyo interés industrial radica en su capacidad para llevar a cabo la oxidación incompleta y asimétrica de azúcares, alcoholes y ácidos, de manera rápida, regio- y estereoselectiva, con un rendimiento elevado (Keliang y Dongzhi, 2006). En el caso de la asimilación de glicerol están implicadas únicamente dos rutas metabólicas: una de oxidación directa y otra fosforilativa, que difieren en la localización y en su función en la célula (Claret y col., 1994).

La ruta de oxidación directa es la responsable de la oxidación parcial de glicerol a DHA por la acción de la enzima glicerol deshidrogenasa, que está acoplada a la cadena respiratoria para la generación de energía. Dicha enzima está localizada en la membrana citoplasmática y posee el centro activo orientado hacia el periplasma. De este modo, el sustrato únicamente tiene que atravesar la membrana exterior para alcanzar el centro activo (no se requiere el transporte activo al interior de la célula) y el producto es excretado directamente al entorno a través de las porinas de la membrana, favoreciéndose su acumulación en el medio (Deppenmeier y col., 2002). Además de DHA, también se produce gliceraldehído de manera análoga, a través de la enzima alcohol deshidrogenasa situada en la membrana citoplasmática. Sin embargo, en este último caso, el gliceraldehído es transformado directamente a ácido glicérico mediante una enzima aún sin identificar (Svitel y Sturdik, 1994; Habe y col., 2010; Sato y col., 2013).

El crecimiento del microorganismo se produce mediante la ruta fosforilativa que tiene lugar en el citoplasma y, por tanto, requiere el transporte activo del sustrato al interior de la célula, con el consiguiente gasto energético. En una primera etapa, el glicerol se fosforila a glicerol-3-fosfato y a continuación, se produce una segunda etapa de deshidrogenación a dihidroxiacetona fosfato. Este último compuesto es metabolizado posteriormente a través de la ruta de las pentosas asegurando el crecimiento celular (Claret y col., 1994). Cabe destacar que el rendimiento biomasa/sustrato es muy bajo en esta bacteria probablemente debido a un limitado sistema de transporte de electrones que hace que la etapa de fosforilación no sea muy eficiente (Olijve y Kok, 1979; Prust y col., 2005). Sin embargo, la oxidación parcial de glicerol puede llevarse a cabo

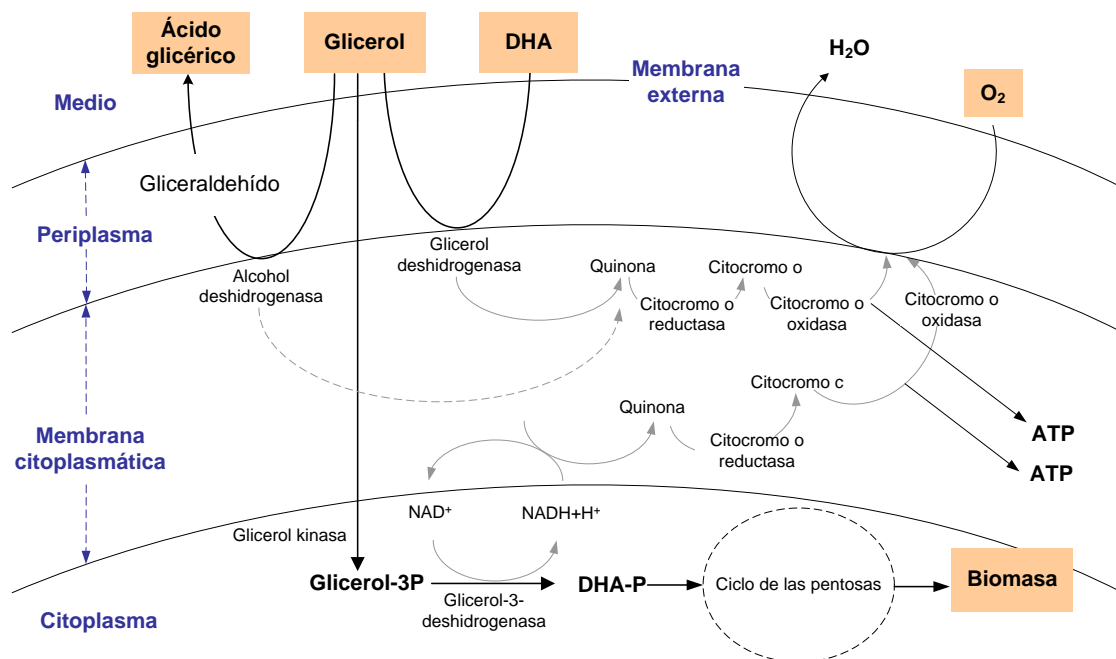


Figura 2.1. Esquema simplificado del metabolismo de G.oxydans. Figura adaptada de Claret y col. (1994).

En este apartado se enumeran los reactivos comerciales empleados para el desarrollo de la presente Tesis Doctoral, especificando la marca, la pureza, el código de producto y el uso que se ha dado a cada uno de ellos en la Tabla 2.1.

63

sobrenadante de la fracción principal más densa que contiene la glicerina. A continuación, se eliminó el metanol de la fracción principal mediante un proceso de burbujeo de aire en vitrina durante 30 minutos para evitar la toxicidad de este compuesto en los experimentos posteriores. Finalmente, se determinó la composición de la fracción tratada de glicerol crudo mediante diferentes técnicas que comprenden la cromatografía líquida de alta resolución, la cromatografía iónica, la termogravimetría y la volumetría de Karl-Fischer.

Tabla 2.1. Listado de los reactivos comerciales empleados en el presente trabajo para diferentes usos.

Compuesto	Marca	Pureza (%)	Código	Usos
Ácido acético	Sigma-Aldrich	99,7	320099	Formulación tampón
Ácido cítrico	Sigma-Aldrich	>99,5	251275	Formulación tampón
Ácido glicérico	Sigma-Aldrich	99	367494	Patrón HPLC
Ácido sulfúrico	Sigma-Aldrich	95-98	320501	Fase móvil HPLC
Acetato de sodio	Sigma-Aldrich	>99,5	32318	Formulación tampón
Alcohol isopropílico	Cor Química	70	123	Esterilización de superficies
Agar	Sigma-Aldrich	95	05039	Formulación del medio sólido
CaCO ₃	Sigma-Aldrich	99	C6033	Preparación tampón
Carbol-fucsina	Fluka	-	21820	Tinción bacteriana
Citrato sódico	Sigma-Aldrich	99	W302600	Formulación tampón
Dihidroxiacetona	Merck	98	8.20482.0250	Experimentación y patrón HPLC
Extracto de levadura	Sigma-Aldrich	-	Y1625	Fuente de nitrógeno
Gel PVA LentiKats	geniaLab	-	50.10.0100.01001	Inmovilización
Gliceraldehído	Sigma-Aldrich	90	G5001	Patrón HPLC
Glicerol	Sigma-Aldrich	>99,5	G9012	Sustrato y patrón HPLC
K ₂ HPO ₄	Sigma-Aldrich	>99	795488	Formulación tampón
KH ₂ PO ₄	Panreac	>98	141509.1211	Formulación tampón
NaCl	Sigma-Aldrich	>99	793566	Preparación suero salino
Peptona	Cultimed	-	403695.1210	Fuente de nitrógeno
Solución estabilizadora LentiKats	GeniaLab	-	50.20.0100.10001	Inmovilización

Tabla 2.2. Composición del glicerol crudo suministrado por Biocom Energía S.L.

Compuesto	Concentración
Glicerol	68 (g/L)
Agua	32,5 (% p/p)
Cenizas	5 (% p/p)
Cloruros	44,1 (g/L)
Fosfatos	3,7 (g/L)

2.1.3 Medios de cultivo

La composición de los medios empleados tanto para la conservación del microorganismo, como para el crecimiento del mismo y para los estudios de producción de DHA con las células en *resting cells* se muestra en las Tablas 2.3 a 2.6. Cabe destacar que en la preparación de todos ellos se ha empleado agua ultrapura con el objetivo de evitar interferencias en los resultados por la presencia de impurezas.

Tabla 2.3. Composición del medio de conservación del microorganismo a -80°C.

Compuesto	Concentración (g/L)
Glicerol	500
NaCl	9

Tabla 2.4. *Composición del medio complejo empleado para el crecimiento del microorganismo en medio líquido para las etapas de preinóculo e inóculo y para su cultivo en medio sólido.*

Compuesto	Concentración (g/L)
Glicerol	25
Extracto de levadura	5
Peptona	3
Agar (sólo para medio sólido)	15

Tabla 2.5. *Composición del medio sintético empleado para los ensayos de actividad enzimática y resting cells ($pH = 6$).*

Compuesto	Concentración (g/L)
Glicerol	46,00
K_2HPO_4	0,21
KH_2PO_4	1,20

Tabla 2.6. *Composición del medio sintético empleado para la producción con resting cells ($pH = 5,5$).*

Compuesto	Concentración (g/L)
Glicerol	25,00
Ácido acético	0,62
Acetato de sodio	2,34

2.2 EQUIPOS

En este apartado se describen los equipos e instalaciones empleados en la parte experimental de la presente Tesis Doctoral, clasificados según su funcionalidad.

2.2.1 Equipos para trabajar en condiciones de esterilidad

- *Autoclave*

La esterilización de todos los materiales y medios de cultivo empleados (no sensibles al calor) se ha llevado a cabo mediante un método térmico, por calor húmedo, en un autoclave de la marca JP Selecta, modelo Presoclave II 80. Se trata de un modelo de autoclave vertical con una capacidad de 80 L, capaz de operar en un intervalo de temperaturas de 115 a 134 °C (0,62 a 2 bar).

- *Cabina de flujo laminar*

La manipulación del microorganismo, de los medios de cultivo y de los materiales estériles, así como la extracción de muestras de los experimentos realizados en matraz *Erlenmeyer*, se ha llevado a cabo bajo una atmósfera estéril proporcionada por una cabina de flujo laminar vertical de la marca TELSTAR, modelo Mini-V/PCR de clase 100. Dicha cabina consta de un impulsor de aire, cuya velocidad de impulsión puede alcanzar hasta 0,45 m/s, un filtro de aspiración y un filtro absoluto HEPA, cuya función consiste en esterilizar el aire del exterior por filtración. De este modo, el aire limpio inyectado en el interior de la cabina a través del impulsor evita que haya partículas en suspensión en la zona de trabajo y actúa de barrera, impidiendo la contaminación por microorganismos externos. Además, esta cabina dispone de una lámpara de luz ultravioleta para esterilizar la superficie de trabajo.

2.2.2 Equipos para la conservación y el cultivo de células

- *Ultracongelador*

Para la conservación del microorganismo a largo plazo se ha empleado un ultracongelador de 334 L de capacidad, de la marca SANYO, modelo VIP, serie MDF-U33V, que permite preservar el material biológico a temperaturas de entre -50 y -86 °C.

- **Estufa de cultivo**

El cultivo del microorganismo en medio sólido se ha realizado en el interior de una estufa bacteriológica de convección natural de la marca HERAEUS (B6), equipada con un controlador de temperatura que permite trabajar a temperaturas entre 5 y 70 °C, con una estabilidad de ± 1 °C en el espacio y de $\pm 0,2$ °C en el tiempo a 37 °C.

- **Incubadora orbital**

El crecimiento del microorganismo en medio líquido, así como gran parte de los experimentos de producción de DHA se han realizado en matraces *Erlenmeyer* agitados en una incubadora de sobremesa con movimiento orbital de 25 mm de diámetro, de la marca Sartorius, modelo Certomat® 1S, con calefacción por circulación de aire. Este modelo de incubadora tiene una capacidad de hasta 20 matraces *Erlenmeyer* de 250 mL y permite trabajar en un rango de temperaturas desde temperatura ambiente +8 °C hasta 60 °C y un rango de agitaciones desde 40 hasta 400 rpm, con una desviación máxima del $\pm 1\%$ con respecto al valor más alto.

- **Biorreactor**

Los experimentos de producción de DHA a mayor escala se han realizado en biorreactores comerciales de tipo tanque agitado de 1 y 2 L, modelo BIOSTAT® B plus, suministrados por Sartorius BBI Systems. Un esquema de la instalación experimental se muestra en la Figura 2.2.

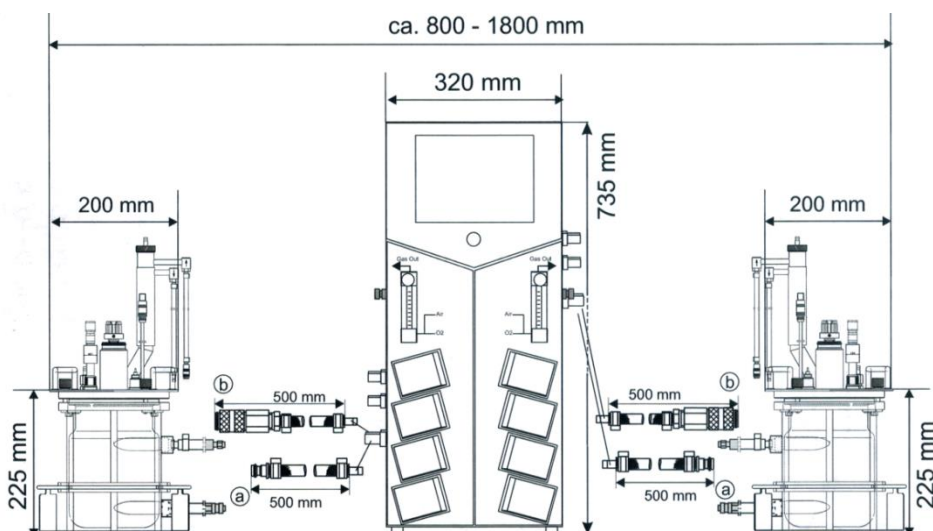


Figura 2.2. Esquema de la instalación experimental formada por una unidad de control (en el centro) y dos cubas de 1 L de capacidad (a los lados).

La instalación experimental mostrada en la figura anterior consta de una o dos cubas de reacción, construidas en vidrio de borosilicato y con una doble pared a modo de camisa por la que pasa el fluido refrigerante, conectadas a una unidad de control encargada de registrar todas las señales procedentes de las sondas y/o electrodos sumergidos en el caldo, así como de controlar aquellas variables de interés en el proceso, a través del software MFCS/WIN 3. Los diferentes sistemas de medida y control de variables empleados en este trabajo se describen a continuación.

- Sistema de medida y control de temperatura

El biorreactor está equipado con un controlador digital PID y un sensor Pt-100 encargado de medir la temperatura y transmitir la señal al controlador, de modo que, una vez fijada la temperatura de consigna, el controlador actúa sobre la válvula de refrigeración y sobre la resistencia eléctrica de 600 W para mantener dicho valor con una sensibilidad de 0,1 °C. El equipo puede operar a temperaturas entre 0 y 100 °C.

- Sistema de medida y control de la agitación

La velocidad de agitación se regula con un controlador digital PID y se mide con un tacómetro, pudiéndose fijar en un valor comprendido entre 0 y 2000 rpm, con una resolución de ± 10 rpm. En este caso, el controlador actúa sobre un motor de 180 W de potencia máxima, que ejerce su acción sobre una varilla de acero inoxidable sobre la que se encuentran los agitadores de turbina de seis palas planas.

- Sistema de aireación

El aire, impulsado mediante un compresor, se suministra al sistema previamente filtrado para eliminar contaminantes a través de un filtro estéril de 0,2 μm de diámetro de poro y se distribuye en el caldo por burbujeo desde la parte inferior de la cuba a través de un difusor toroidal. El caudal de aire se ajusta mediante un controlador de flujo másico, que también permite la mezcla de dos gases como pueden ser el aire y el oxígeno, con el objetivo de regular automáticamente la concentración de oxígeno disuelto en el caldo.

- Sistema de medida y control del oxígeno disuelto

La medida del oxígeno disuelto en el caldo se realiza mediante un electrodo polarográfico de la marca Hamilton que consta de una celda electroquímica compuesta por un ánodo de plata y un cátodo de platino sumergidos en una solución de cloruro potásico. Dicha celda está separada del medio de cultivo por una membrana de teflón permeable al oxígeno. La señal generada se ofrece en pantalla y se almacena en un

ordenador como una medida del porcentaje de oxígeno disuelto en el caldo con respecto al valor de saturación en las mismas condiciones. El control de esta variable se lleva a cabo mediante un controlador PID en cascada que actúa sobre el caudal de aire y/o sobre la velocidad de agitación.

- Sistema de medida y control del pH

Para la medida del pH se utilizó un electrodo de la marca Hamilton, cuyo intervalo de medida varía entre 2 y 12 unidades de pH. En este caso, un controlador digital PID actúa sobre las bombas de alimentación de ácido y de base en función de la señal proporcionada por el electrodo con el objetivo de controlar el pH y establecer su valor en torno al punto de consigna prefijado.

- Sistema de medida del oxígeno y dióxido de carbono en la corriente de salida

Para la medida simultánea del oxígeno y del dióxido de carbono contenidos en la corriente gaseosa de salida del biorreactor se empleó el sensor combinado BioPAT® Xgas de la compañía Sartorius Stedim Biotech. El intervalo de concentraciones que puede ser medido se encuentra entre 1-50 % para el oxígeno, y entre 0-10 % para el dióxido de carbono, con una precisión de 0,2 %. Las medidas incluyen una compensación automática por la humedad y la presión.

Siguiendo con la descripción física del dispositivo experimental, cabe destacar que todas las sondas y electrodos descritos anteriormente para la medida y el control de las distintas variables se sumergen en el caldo contenido en la cuba a través de los orificios disponibles en la tapa de acero inoxidable que, además, está provista del eje de agitación, de un condensador para evitar la evaporación de líquido, de un tubo para extraer muestras del caldo, del difusor de aire mencionado en la descripción del sistema de aireación, de tabiques deflectores para evitar la formación de vórtices y de tubos de entrada de disoluciones, entre otros. La vista lateral de una cuba de reacción típica con los accesorios anteriormente mencionados se muestra en la Figura 2.3, mientras que un esquema de la planta se puede observar en la Figura 2.4, junto con la descripción de cada uno de los orificios de la tapa.

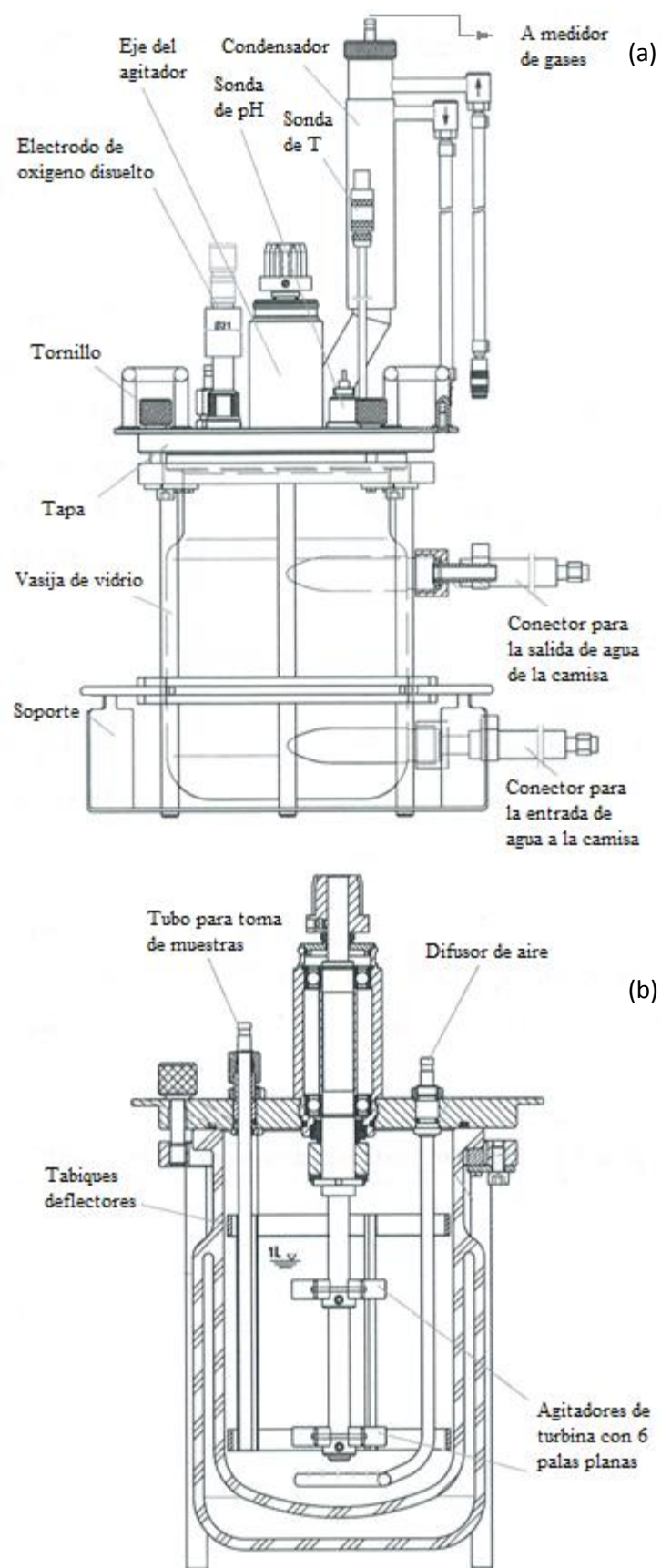


Figura 2.3. Esquema de una cuba de reacción típica: (a) vista lateral y (b) sección.

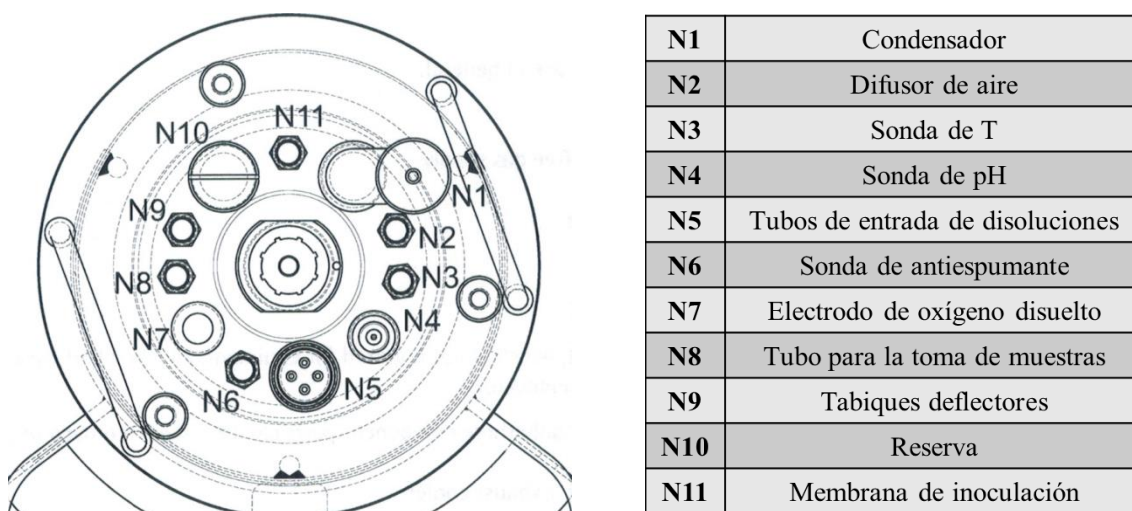


Figura 2.4. Esquema en planta de una cuba de reacción típica y descripción de cada uno de los orificios disponibles en la tapa.

2.2.3 Equipos de medida y análisis

- **Balanzas**

La masa de los compuestos empleados en la formulación de los medios de cultivo se ha determinado en una balanza de precisión de Sartorius, modelo Practum 1102-1S, con capacidad de hasta 1100 g y una precisión de $\pm 0,01$ g. Asimismo, para la preparación de disoluciones patrón se ha empleado una balanza analítica de Mettler Toledo, modelo MS204S, con una capacidad de hasta 220 g y una precisión de $\pm 0,0001$ g.

- **Cromatógrafo de líquidos de alta resolución (HPLC)**

La cuantificación de los distintos compuestos involucrados en la biotransformación: glicerol, DHA y ácido glicérico, se ha llevado a cabo mediante el análisis de las muestras del caldo de cultivo por cromatografía líquida de alta resolución. Para ello, se ha empleado un cromatógrafo de líquidos de la marca Agilent, modelo Series 1100. Este equipo consta de varios módulos controlados por ordenador a través del software Agilent ChemStation® de Agilent Technologies, que permite la creación y modificación de métodos de análisis, el control de la adquisición y almacenamiento de datos y el análisis mediante integración de los datos obtenidos. Un esquema del equipo se muestra en la Figura 2.5 y la funcionalidad de los distintos módulos que lo componen se describe a continuación.

- Cabina de disolvente

Este módulo alberga las botellas con los distintos disolventes que alimentan el sistema actuando como eluyentes en el proceso de análisis.

- Desgasificador de vacío

En este módulo se lleva a cabo la eliminación de las posibles burbujas arrastradas por el eluyente para evitar un mal funcionamiento de la bomba.

- Bomba cuaternaria

La bomba cuaternaria impulsa el caudal programado de eluyente por todo el sistema. Este módulo permite trabajar con gradientes de composición y caudal y dispone de una válvula de purga para cebar la cabeza de la bomba.

- Inyector automático

Este módulo dispone de una bandeja porta viales, un brazo móvil automático encargado de transportar el vial en el orden correspondiente hacia la zona de inyección y una jeringa responsable de la extracción de un volumen de muestra programado y de su introducción en una válvula de seis vías donde se mezclará con el eluyente.

- Horno de columna

Se trata de un compartimento termostatzado que alberga la columna a través de la cual fluye el eluyente junto con la muestra con el objetivo de separar los componentes de la misma gracias a las distintas interacciones físicas o químicas que se producen entre cada uno de los componentes y el relleno de la columna.

- Detector de diodos

Este detector permite obtener el espectro de absorción de la muestra en función de la longitud de onda y del tiempo en todo el intervalo ultravioleta-visible (UV-Vis). Para ello, el módulo consta de una lámpara de deuterio que emite una radiación que atraviesa la muestra y posteriormente es dispersada a través de una red de difracción holográfica cóncava y reflejada sobre una matriz de fotodiodos, obteniéndose las imágenes espectrales.

- Detector de índice de refracción

Este módulo consta de un refractómetro diferencial que mide la desviación de un haz de luz producida por la diferencia en el índice de refracción entre los líquidos contenidos en las celdas de muestra y de referencia. Para ello, el haz de luz procedente de la

lámpara atraviesa las celdas de muestra y referencia y, a continuación, es recibido por el receptor de luz que contiene dos diodos, cada uno de los cuales produce una corriente eléctrica proporcional a la cantidad de luz que les llega. Cabe destacar que el valor del índice de refracción depende de la longitud de onda de la luz incidente y de la densidad del medio.

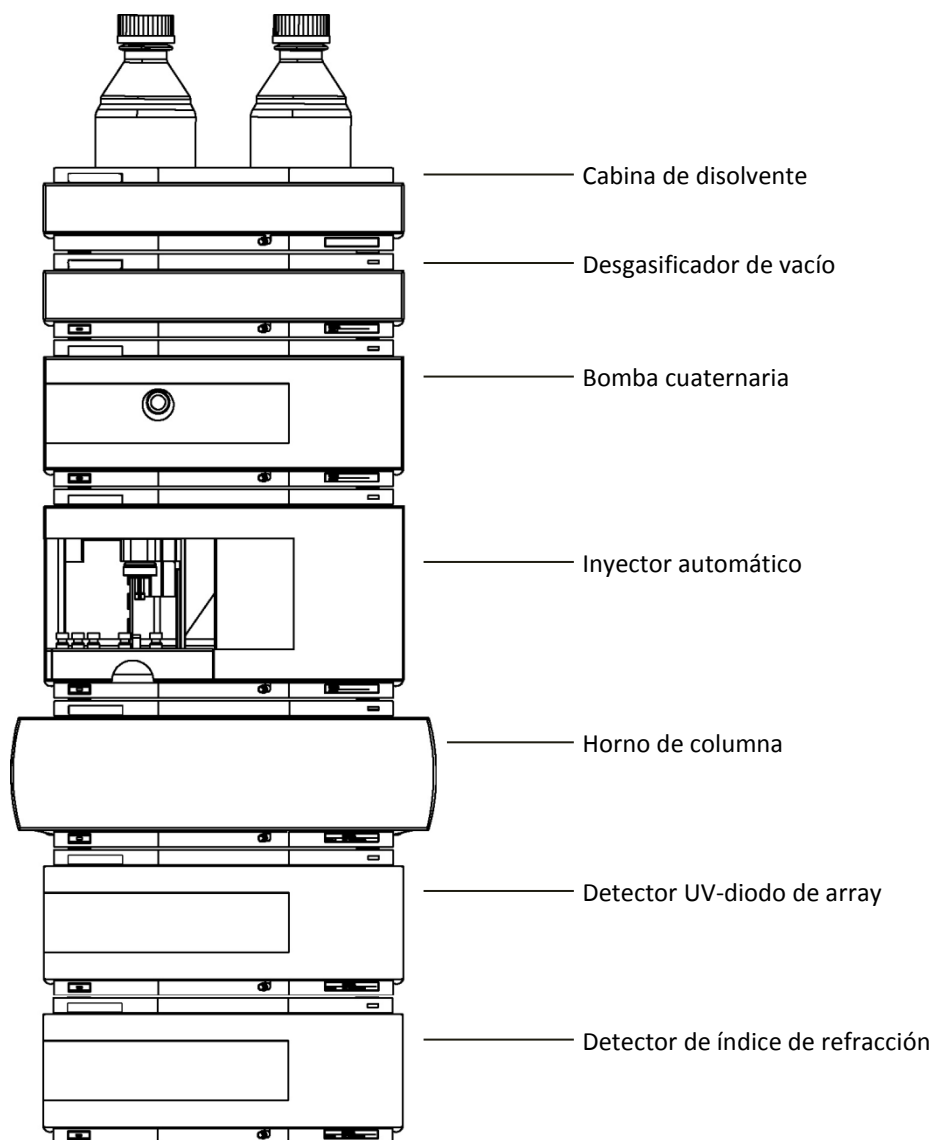


Figura 2.5. Esquema del cromatógrafo de líquidos de alta resolución empleado para la cuantificación de los distintos compuestos involucrados en la biotransformación: glicerol, DHA y ácido glicérico.

- **Densímetro**

La densidad del caldo de cultivo se ha determinado mediante un densímetro digital Anton Paar DMA 5000 que presenta un rango de medición de 0 a 3 g/cm³ con una precisión de $\pm 0,000005$ g/cm³.

- ***Espectrofotómetro de absorción UV-visible***

El valor de la absorbancia de las muestras se ha determinado mediante un espectrofotómetro de absorción ultravioleta-visible de doble haz de la marca Shimadzu, modelo UV 1603, con las siguientes características técnicas:

- Intervalo de medida de la longitud de onda: 190-1100 nm.
- Anchura de banda espectral: 2 nm.
- Lámpara de deuterio: fuente de luz para la realizar la medida de absorción en la región ultravioleta.
- Lámpara halógena de tungsteno: fuente de luz para realizar la medida de absorción en la región del visible y el infrarrojo próximo.

- ***pH-metro***

El pH de las disoluciones se ha determinado empleando un medidor de pH modelo basic 20 de CRISON que dispone de un mecanismo de compensación automática de temperatura y mide valores de pH entre 2 y 16 unidades con una precisión de $\pm 0,01$.

- ***Tensiómetro***

La tensión superficial del caldo de cultivo se midió con un tensiómetro digital OCA 15 de Dataphysics, capaz de determinar esta variable a partir del cálculo del ángulo de contacto de una gota colgante de un tubo capilar gracias a un sistema de análisis y medición del contorno de la gota. El rango de medición es de 0,1 a 2000 mN/m con una precisión de $\pm 0,01$ mN/m.

- ***Viscosímetro***

La viscosidad de las muestras se ha determinado con un viscosímetro de caída de bola Anton Paar, modelo AMNv. El rango de medición es de 0,3 a 1000 mPa·s con una precisión de $\pm 0,001$ mPa·s.

2.2.4 Equipos auxiliares

- ***Centrífuga***

La operación de separación de la biomasa del caldo de cultivo, bien para analizar el sobrenadante, o bien para recuperar la biomasa, se ha llevado a cabo en una centrífuga de la marca SIGMA, modelo 4-16K, cuyas características técnicas se especifican a continuación:

- Rotores intercambiables: dispone de un rotor que gira a una velocidad máxima de 9000 rpm, apto para 6 botes de 250 mL de capacidad, con posibilidad de acoplar un accesorio para 6 tubos de 60 mL y de otro rotor con una velocidad máxima de giro de 15000 rpm para 30 tubos Eppendorf de 1,5 mL.
- Intervalo de control de temperatura: -20 a 70 °C.

- ***Estufa de secado***

El secado del material se ha realizado en una estufa de la marca Selecta, modelo S-202, que opera en un rango de temperaturas de 40 a 200 °C con una estabilidad de $\pm 0,5$ %.

- ***Sistema de purificación de agua***

El agua empleada en la preparación de disoluciones y medios de cultivo ha sido purificada previamente por filtración a través de dos cartuchos de carbón activo e irradiación con luz UV con el objetivo de eliminar tanto los iones presentes, como el contenido en materia orgánica y la contaminación biológica. Este proceso se ha realizado en un equipo Arium 611UV de Sartorius que permite obtener agua ASTM tipo I, cuya resistividad es superior a 18,2 M Ω ·cm a 25 °C, su carbono orgánico total menor de 1 ppb y su contaminación bacteriana inferior a 1 UFC/100 mL.

- ***Impresora de LentiKats***

Para la inmovilización del microorganismo en LentiKats se ha empleado un dispositivo como el que se muestra en la Figura 2.6, que dispone de un cabezal con 400 varillas metálicas para la generación de 400 partículas de idéntico tamaño y espesor en una sola etapa, siguiendo la metodología descrita en el apartado 2.3.7.

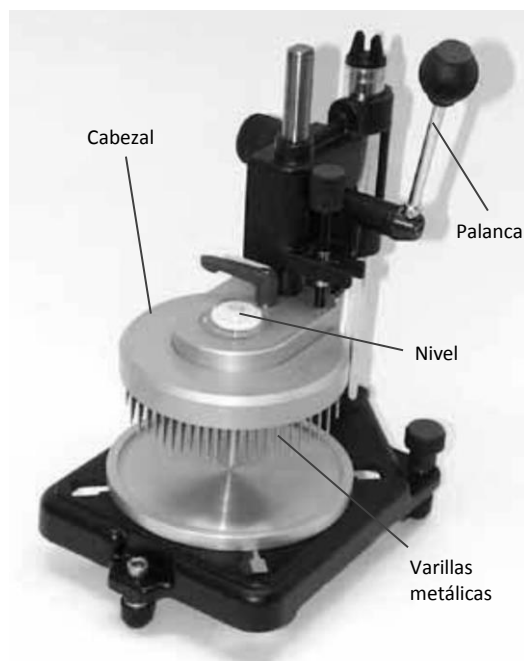


Figura 2.6. *Impresora de LentiKats.*

- **Microscopio óptico**

Para la visualización del cultivo se ha empleado un microscopio óptico de la marca Zeiss, modelo Axioplan 2, que dispone de una cámara adjunta para la captación de imágenes.

2.3 PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

En este apartado se describen los protocolos experimentales adoptados para trabajar en condiciones de esterilidad, conservar el microorganismo a largo plazo, obtener el inóculo que se empleará para realizar los experimentos de producción de DHA, evaluar la actividad enzimática por medio de un test, contar células viables en placa e inmovilizar el microorganismo en LentiKats.

2.3.1 Protocolo de esterilización y manipulación

La esterilización de los medios de cultivo no sensibles al calor y el material reutilizable se ha asegurado mediante un método térmico de esterilización por vapor a presión, consistente en mantener los objetos a 121 °C durante 20 minutos en el autoclave descrito en el apartado anterior. Por otro lado, dado que las altas temperaturas inducen

la degradación de la DHA, las disoluciones de este compuesto se han esterilizado mediante filtración a través de filtros de tamaño de poro de 20 μm .

Para la manipulación del microorganismo y el material estéril se ha empleado la cámara de flujo laminar previamente esterilizada por lavado con isopropanol y/o irradiación con luz UV. Esta etapa es crucial para evitar contaminaciones por otros microorganismos que puedan distorsionar los resultados experimentales.

2.3.2 Protocolo de conservación del microorganismo

El protocolo de conservación a largo plazo consiste en almacenar el microorganismo en la disolución descrita en la Tabla 2.3 a una temperatura de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, donde puede mantenerse viable durante meses. Para ello, el microorganismo liofilizado suministrado por la CECT se rehidrata en un medio de cultivo complejo (ver composición en la Tabla 2.4) y se incuba a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 200 rpm en una incubadora orbital hasta que se alcanza la fase exponencial de crecimiento, momento en el que se toma el volumen necesario para inocular un medio fresco con un 20% v/v y se incuba de nuevo en las mismas condiciones hasta alcanzar la mitad de la fase exponencial. En este momento, el microorganismo se separa del caldo de cultivo por centrifugación a 9000 rpm durante 5 minutos y se resuspende en el medio de conservación, de modo que la disolución tenga una concentración de 5 g/L de biomasa. Dicha disolución se almacena en tubos *Eppendorf* estériles de 1,5 mL de capacidad a una temperatura de $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.3.3 Preparación del inóculo

La metodología experimental desarrollada por el Grupo de Investigación *Fisicoquímica de los Procesos Industriales y Medioambientales* para la obtención de un biocatalizador activo a partir del *stock* congelado consiste en llevar a cabo dos etapas sucesivas de crecimiento en incubadora orbital. La primera de ellas, denominada **etapa de preinóculo**, tiene por objetivo la adaptación de las células procedentes del *stock* congelado al nuevo medio de cultivo y a las condiciones de trabajo, mientras que el segundo crecimiento o **etapa de inóculo** se realiza para que todas las células estén en el mismo estado metabólico y, de este modo, asegurar la reproducibilidad de los experimentos posteriores.

En este trabajo, la etapa de preinóculo se lleva a cabo inoculando 1 mL del *stock* (previamente descongelado) en 50 mL de medio de cultivo complejo contenidos en un

matraz *Erlenmeyer* de 250 mL con un tapón de algodón que permite el paso de aire libre de partículas. Dicho matraz se incuba durante 8 h a 30 °C y 200 rpm, tiempo requerido por el microorganismo para alcanzar la mitad de la fase exponencial, momento en el cual presenta su máxima actividad metabólica. En este momento, se toma un volumen de 1 mL de caldo de cultivo del preinóculo y se emplea para inocular un nuevo medio complejo, donde se incuba durante 13 h en las mismas condiciones descritas anteriormente, hasta obtener nuevamente un cultivo en la mitad de la fase exponencial de crecimiento, lo suficientemente activo y uniforme como para ser utilizado como inóculo en los experimentos de producción de DHA.

2.3.4 Experimentos de producción de DHA

Una vez obtenido un inóculo activo, según la metodología descrita en el apartado anterior, dicho inóculo se emplea en los experimentos de producción de DHA, bien con las células en crecimiento, o bien con las células en estado de *resting cells*. Los experimentos se han realizado en dos escalas distintas: en matraz *Erlenmeyer* de 250 mL y/o en biorreactor de 1 o 2 L de capacidad. Para ello, se han seguido las etapas que se ilustran en la Figura 2.7 y que se detallan a continuación:

- ***En crecimiento***

Los experimentos de producción de DHA realizados con las células en crecimiento, esto es, con fuentes de nitrógeno complejas en el medio (extracto de levadura y peptona) además de glicerol, se han llevado a cabo en matraces *Erlenmeyer* de 250 mL de capacidad, llenados con un volumen total de 50 mL; un 20 % v/v corresponde al volumen tomado del inóculo y el resto a medio fresco, de modo que todos los experimentos comiencen con una concentración de biomasa de 0,1 g/L, salvo que se especifique otro valor. Estos matraces, tapados con un tapón poroso de algodón, se agitan a la velocidad especificada y se termostatan a la temperatura correspondiente, generalmente 200 rpm y 30 °C, empleando una incubadora orbital de sobremesa.

El seguimiento del proceso de producción implica la toma de muestras con el tiempo, usualmente cada 2 h, y su posterior análisis para conocer el pH, la cantidad de biomasa y la composición, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.4. Cabe destacar que únicamente se puede extraer un 10 % v/v del caldo para evitar que se modifiquen las condiciones de aireación y mezcla; por lo tanto, en este caso sólo se pueden extraer 5 mL de muestra por matraz. Por ello, es necesario preparar el número

de matraces adecuado por cada experimento para poder extraer un número de muestras suficiente como para conocer la evolución del sistema con el tiempo.

- ***En resting cells***

Los experimentos de producción de DHA con células en *resting cells* requieren el lavado previo de las células procedentes del inóculo para eliminar cualquier resto de fuente compleja que pudiera dar lugar a crecimiento bacteriano en el experimento de producción. Para ello, el inóculo se centrifuga a 9000 rpm durante 5 minutos para poder eliminar el sobrenadante con los restos de fuente compleja; a continuación, se resuspende el pellet bacteriano en tampón fosfato o acetato (según se indique en la planificación experimental de cada apartado) con el objetivo de lavar las células, se vuelve a centrifugar el caldo resultante y, finalmente, se descarta el sobrenadante y las células se resuspenden en el tampón correspondiente hasta alcanzar una concentración de 2 g/L. Un volumen determinado de este caldo madre se usa posteriormente para inocular un medio que contiene glicerol y tampón para comenzar el experimento de producción de DHA con una concentración de biomasa prefijada.

Estos experimentos se han llevado a cabo tanto en matraz *Erlenmeyer*, siguiendo el protocolo descrito para las células en crecimiento, como en biorreactor de 1 L. En este último caso, el volumen de trabajo ha sido de 0,5 L, la aireación de 0,5 L/min (1 vvm), la temperatura de 30 °C y la agitación comprendida entre 300 y 900 rpm. Del mismo modo que en los experimentos en matraz *Erlenmeyer*, en biorreactor no se ha extraído más del 10 % del volumen total en muestras para evitar modificar las condiciones fluidodinámicas.

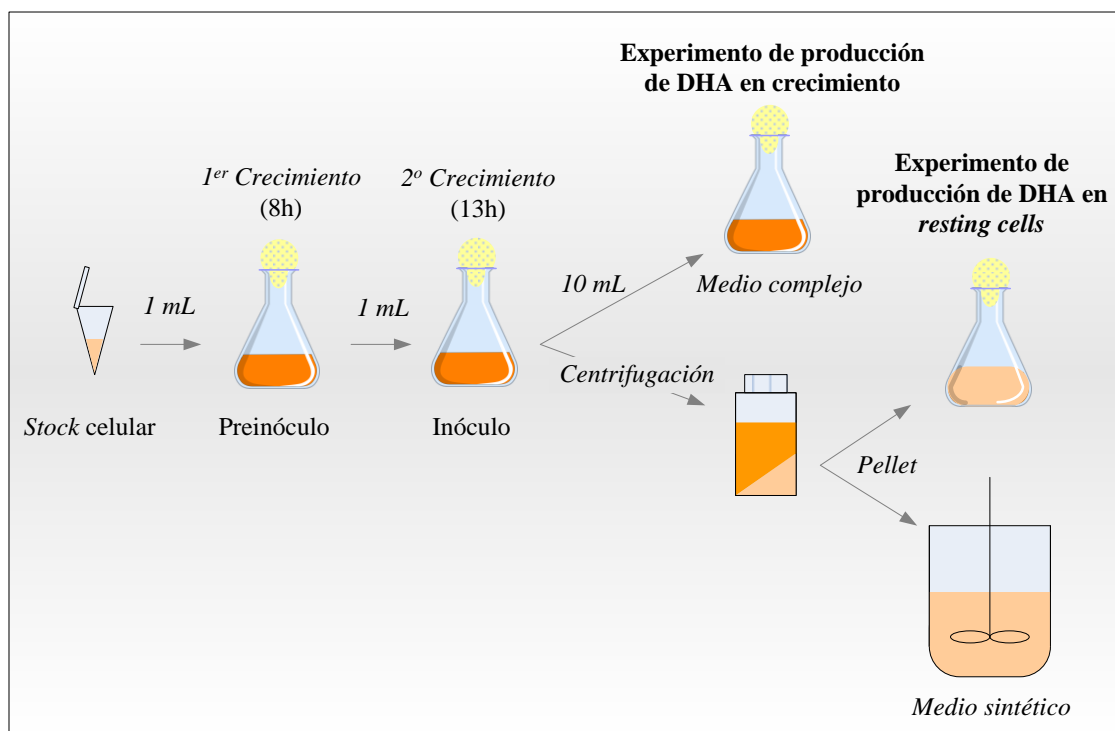


Figura 2.7. Esquema ilustrativo del procedimiento experimental definido para llevar a cabo los experimentos de producción de DHA tanto con células en crecimiento, como con células en resting cells.

2.3.5 Medida de la actividad enzimática

Esta medida se ha realizado basándose en el método propuesto por Nabe y col. (1979) para evaluar la actividad de la enzima glicerol deshidrogenasa, a_0 , expresada como $g_{DHA}/L \cdot h$. El procedimiento experimental llevado a cabo para realizar el test ha sido el siguiente: las células procedentes del inóculo en la mitad de la fase exponencial se centrifugan a 9000 rpm durante 5 minutos y se lavan dos veces con tampón fosfato para eliminar posibles restos de fuente orgánica y evitar así un posible crecimiento durante el ensayo, que invalidaría el test, ya que entrarían en juego las enzimas responsables del crecimiento celular, interfiriendo en los resultados. A continuación, las células se resuspenden en un medio que contiene 25 g/L de glicerol en tampón fosfato a pH 6 con una fortaleza de 20 mM. La reacción tiene lugar en un matraz *Erlenmeyer* de 250 mL con 50 mL de medio, agitado a 200 rpm en incubadora orbital, a una temperatura de 30 °C durante 4 h. El intervalo de concentraciones de biomasa empleado para la realización del test se encuentra entre 0,01-1 g/L, especificándose el dato en cada caso.

La principal diferencia entre este procedimiento experimental y el propuesto por Nabe y col. (1979) y adoptado por diversos autores (Yamada y col., 1979; Ma y col., 2010; Hu y col., 2011) radica en que en el desarrollado en esta Tesis Doctoral se emplea una concentración conocida de biomasa y en el procedimiento descrito en bibliografía no se especifica este valor, usándose cada vez uno distinto, cuestión de suma importancia por las limitaciones que se pueden producir en la actividad enzimática al trabajar con concentraciones de biomasa crecientes a una agitación constante, según los hallazgos presentados en el apartado 4.3 (Figura 4.12). Por lo tanto, los datos de actividad enzimática obtenidos a una agitación establecida de 200 rpm y con una concentración variable de biomasa, como los obtenidos en literatura, pueden no ser comparables si las células están bajo condiciones limitantes de oxígeno. Este hecho puede invalidar el test de actividad enzimática como ensayo estándar.

2.3.6 Conteo de células viables en placa

El recuento del número de células viables (con capacidad de reproducirse) en placa se ha realizado a partir de una muestra recogida durante los experimentos en biorreactor con el objetivo de conocer la afectación de las bacterias tras dichos experimentos, en los cuales han sido sometidas a altos esfuerzos cortantes. Además, esta técnica también se ha empleado para conocer la cantidad de células viables presentes en el inóculo con el tiempo, de cara a escoger el valor más adecuado para proceder a la inmovilización del microorganismo. Para hacer el recuento en placa, un volumen conocido de las muestras recolectadas a distintos tiempos bajo condiciones estériles es diluido varios cientos de veces en suero salino, tomándose una alícuota de cada dilución, que es sembrada mediante el método de extensión en placa e incubada en el medio sólido descrito en la Tabla 2.4 durante 24 h a 30 °C en la estufa de cultivo. Tras este tiempo, se hace un recuento de las colonias emergentes en la placa y se aplica la ecuación [2.1], teniendo en cuenta la dilución (d) para extrapolar este dato y conocer el número de células viables o unidades formadoras de colonia presentes en 1 mL de caldo (UFC/mL). Cabe destacar que únicamente se considera significativo un número de colonias comprendido entre 30 y 300, de ahí la importancia de seleccionar la dilución adecuada.

$$\frac{UFC}{mL} = \frac{N^{\circ} colonias}{V \text{ alícuota (mL)}} \cdot \frac{1}{d} \quad [2.1]$$

2.3.7 Inmovilización del microorganismo

El proceso de inmovilización del microorganismo se ha llevado a cabo siguiendo el manual de instrucciones proporcionado por GeniaLab, empresa suministradora de la impresora de LentiKats y del material necesario para su fabricación. Las etapas involucradas en dicho proceso de fabricación, ilustradas en la Figura 2.8, se describen a continuación:

- En primer lugar, es necesario calentar el gel LentiKats a 90 °C y, una vez fundido, dejarlo enfriar hasta unos 30 °C para evitar daños en el microorganismo durante el proceso de inmovilización.
- El cultivo celular, obtenido según se describe en el apartado 2.3.3, se mezcla bajo agitación vigorosa con el gel atemperado de modo que el cultivo celular constituya el 20 % v/v de la mezcla. Según el manual de fabricación, la concentración inicial de biomasa debe estar entre 10^7 y 10^8 células por cada mL de gel.
- Una vez obtenida una mezcla uniforme, ésta se transvasa a una placa de Petri, que se coloca en la base de la impresora. El proceso de impresión de LentiKats se realiza como sigue: las varillas metálicas del cabezal de la impresora se impregnan con la mezcla por inmersión unos 2 o 3 milímetros gracias a la acción de una palanca. A continuación, se sube lentamente dicha palanca para elevar el cabezal y poder retirar la placa de Petri, que es sustituida por una cubierta estéril donde van a imprimirse las LentiKats al accionar de nuevo la palanca y bajar el cabezal hasta que las varillas metálicas impregnadas con la mezcla entren en contacto con la superficie de la cubierta. De este modo, la mezcla es depositada en la cubierta en forma de esferas de tamaño uniforme.
- Con el objetivo de endurecer las esferas obtenidas en el paso anterior, se lleva a cabo un proceso de secado con ayuda de un ventilador hasta que dichas esferas pierdan, al menos, un 75 % p/p de su masa inicial.
- Finalmente, las LentiKats se transvasan a un recipiente agitado con solución estabilizadora donde van a permanecer durante por lo menos 2 horas con el objetivo de alcanzar su máxima estabilidad mecánica y poder ser usadas posteriormente en los experimentos de producción de DHA.

Por último, se pueden visualizar las colonias presentes en las LentiKats por observación directa al microscopio, previa tinción de las mismas con carbol-fucsina diluido 1:100 durante 30 minutos y posterior lavado con agua durante otros 30 minutos.

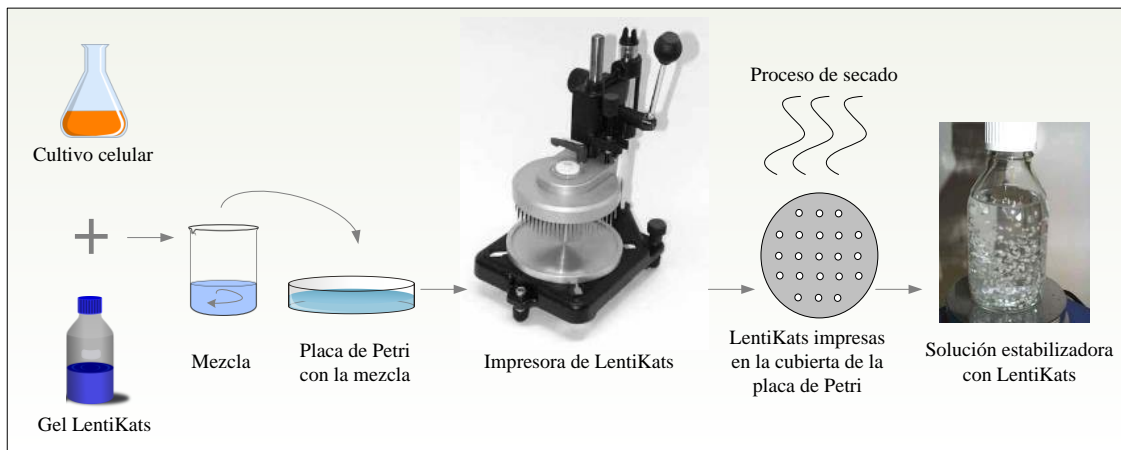


Figura 2.8. Esquema ilustrativo del procedimiento experimental realizado para la fabricación de LentiKats.

2.4 MÉTODOS DE ANÁLISIS

El desarrollo de métodos de análisis adecuados para conocer la composición de las muestras tomadas con el tiempo durante los experimentos es de suma importancia para la obtención de datos fiables y repetitivos que permitan comparar los resultados de los distintos experimentos. En este caso, las muestras de caldo están compuestas por biomasa y por metabolitos que van a requerir para su cuantificación dos métodos de análisis diferentes, descritos en los siguientes apartados.

2.4.1 Análisis de la biomasa

La cuantificación de la biomasa, expresada como gramos de peso seco por litro de medio de cultivo, se ha realizado por espectrofotometría UV-Vis a 600 nm relacionando la absorbancia de la muestra con la concentración de biomasa a través de una ecuación de calibrado.

Para la obtención de dicha ecuación de calibrado se ha seguido el siguiente procedimiento:

Las células se cultivan en medio complejo a 200 rpm y 30 °C hasta alcanzar una densidad óptica elevada. Un volumen conocido del cultivo se centrifuga a 9000 rpm durante 5 minutos en un bote previamente tarado para desechar el sobrenadante y secar el pellet en una estufa a 105 °C hasta alcanzar un peso constante. Con este dato y el volumen se puede calcular la concentración de biomasa que había en el cultivo. Paralelamente se realizan sucesivas diluciones del cultivo remanente y se mide su absorbancia, de modo que se obtienen pares de valores concentración-absorbancia que responden a una expresión lineal de tipo Lambert-Beer, cuya pendiente se calcula por regresión lineal. Cabe destacar que la relación entre concentración y absorbancia es lineal para valores de absorbancia entre 0,1 y 0,9. Por ello, en los casos en los que la absorbancia del cultivo supere el valor del nivel superior del intervalo, será necesario realizar una dilución adecuada para que la absorbancia resultante entre dentro del intervalo en el que se cumple la relación lineal y así, poder calcular la concentración de biomasa correspondiente mediante la recta de calibrado.

El procedimiento descrito anteriormente para la obtención de pares de valores concentración-absorbancia se ha repetido por triplicado con el objetivo de reducir el error experimental, tomando el valor medio de las pendientes como la constante de la recta de calibrado. En la Figura 2.9 se muestran las tres rectas de calibrado obtenidas y en la Tabla 2.7 los valores de las pendientes y la bondad de los ajustes. Con estos datos, la concentración de biomasa puede calcularse a partir de los datos de absorbancia del cultivo ($A_{600\text{nm}}$) aplicando la expresión [2.2], donde d es la dilución de la muestra.

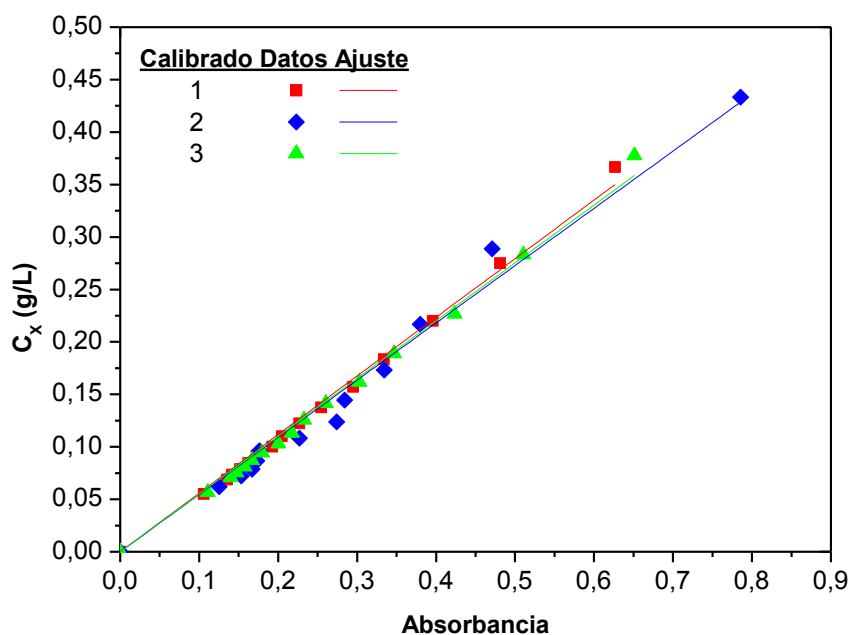


Figura 2.9. Rectas de calibrado C_x -absorbancia por triplicado

Tabla 2.7. Valores de las pendientes de las rectas de calibrado

Calibrado	K (g/L)	r^2
1	0,559	0,998
2	0,545	0,993
3	0,551	0,998
Valor medio	$0,552 \pm 0,007$	

$$C_x \left(\frac{\text{g peso seco}}{L} \right) = 0,552 \cdot A_{600nm} \cdot d \quad [2.2]$$

2.4.2 Análisis del sustrato y de los productos

Los principales metabolitos implicados en este proceso productivo son los siguientes: glicerol, que actúa como sustrato; DHA, como producto principal; gliceraldehído, como producto intermedio y ácido glicérico, que constituye el principal subproducto, de acuerdo con el esquema de reacción mostrado en la Figura 2.1. Para el seguimiento de todos ellos se ha escogido la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) como técnica analítica.

Dadas las características químicas de los compuestos de interés, se ha empleado una fase móvil compuesta por H_2SO_4 diluido y una columna de exclusión de iones Rezex ROA-Organic Acid H^+ (8 %) de Phenomenex, de 300 x 7,8 mm de tamaño y cuyo relleno está compuesto por sulfonato de estireno-divinilbenceno. Esta columna está indicada para la separación de ácidos orgánicos en combinación con carbohidratos, alcoholes, ácidos grasos entre otros. Por lo tanto, es apropiada para la cuantificación simultánea de los compuestos de interés presentes en las muestras del caldo de reacción, previa filtración de las mismas para eliminar la biomasa.

El primer problema que se plantea es que los tiempos de retención del glicerol y la DHA son idénticos, del mismo modo que ocurre con los tiempos de retención del gliceraldehído y el ácido glicérico, dado que son compuestos muy similares. Atendiendo a la estructura química de los compuestos (Figura 2.10), se observa que todos ellos excepto el glicerol presentan dobles enlaces y, por tanto, su absorbancia es máxima en la región UV, pudiendo cuantificarse a través del Detector de Diodo de Array (DAD).

Para establecer la longitud de onda (λ) a la que se presenta el máximo de absorbancia para cada compuesto, se realizó un barrido espectral como el que se muestra en la Figura 2.11. En dicha figura, se observa que la DHA presenta su máxima señal a una longitud de onda de 270 nm, el ácido glicérico y el gliceraldehído a 210 nm y el glicerol no absorbe a estas longitudes de onda. Por lo tanto, el glicerol puede analizarse con el detector de Índice de Refracción (RID), la DHA puede cuantificarse a través del detector de diodos a 270 nm y el ácido glicérico y el gliceraldehído mediante el mismo detector pero a 210 nm y modificando las condiciones del análisis (temperatura, caudal y composición de la fase móvil) para conseguir la separación de los picos. Las condiciones finales escogidas para la separación adecuada de las señales de los compuestos son las que se muestran en la Tabla 2.8, obteniéndose un cromatograma tipo como el de la Figura 2.12 para el detector de diodos a 210 nm.

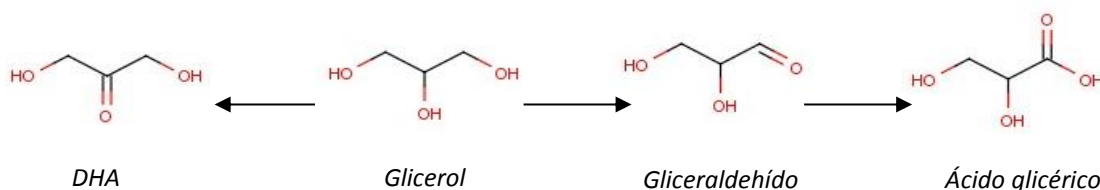


Figura 2.10. Estructura química de los metabolitos involucrados en el proceso de producción de DHA a partir de glicerol con *G. oxydans*.

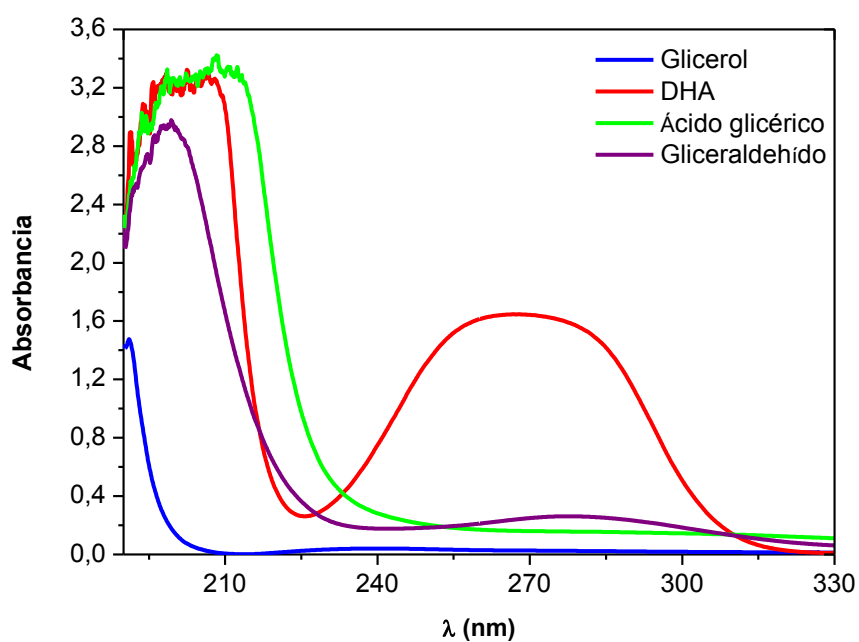


Figura 2.11. Barrido de absorbancia a distintas longitudes de onda en la región UV para los distintos compuestos involucrados en la biotransformación: glicerol, DHA, gliceraldehído y ácido glicérico.

Tabla 2.8. Condiciones del método de análisis propuesto.

Parámetro	Valor
Temperatura	80 °C
Caudal fase móvil	0,5 mL/min
Composición fase móvil	H ₂ SO ₄ (1,19 mM)
Tiempo de análisis	30 min
Volumen de inyección	15 µL

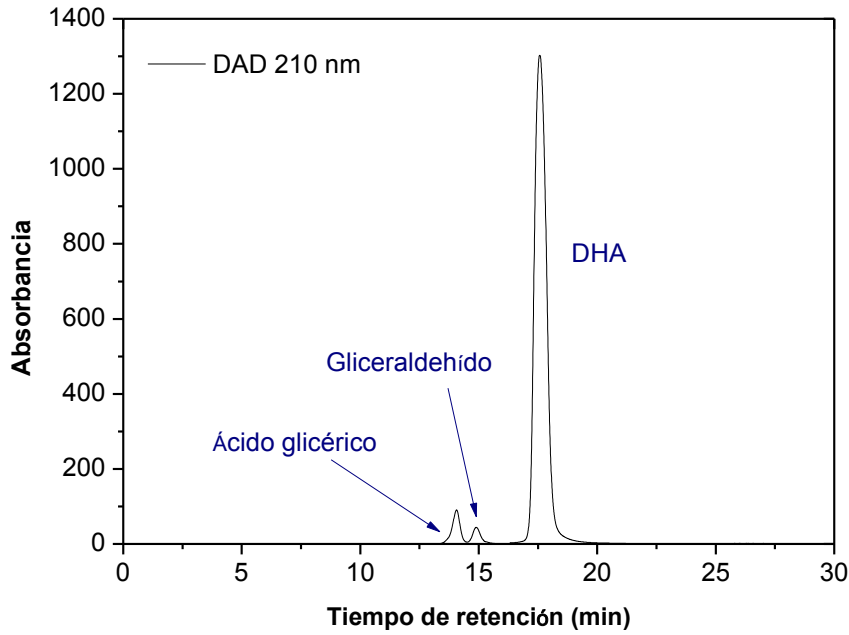


Figura 2.12. Cromatograma tipo de una mezcla de glicerol, DHA, ácido glicérico y gliceraldehído obtenido tras el análisis con el detector de diodo de array a una longitud de onda de 210 nm.

La cuantificación de los compuestos presentes en una muestra se lleva a cabo identificando cada compuesto según su tiempo de retención y relacionando el área del pico correspondiente a cada compuesto con su concentración a través de una constante de calibrado, según la ecuación [2.3], donde C_j es la concentración del compuesto “j”; $K_j^{Detector}$ es la constante de calibrado del detector para el compuesto “j” y el numerador es el área correspondiente al pico del compuesto “j” en un detector determinado. En el caso del glicerol, dado que su pico aparece solapado con el de la DHA en el detector RID (ambos compuestos presentan el mismo tiempo de retención), el cálculo de la concentración se realiza mediante la ecuación [2.4], que resta el área correspondiente a la concentración de DHA del área total obtenida en el detector RID para ambos compuestos.

$$C_j (g / L) = \frac{\text{Área}_j^{Detector}}{K_j^{Detector}} \quad [2.3]$$

$$C_{Glic} (g / L) = \frac{\text{Área}_{Glic+DHA}^{RID} - \text{Área}_{DHA}^{RID}}{K_{Glic}^{RID}} = \frac{\text{Área}_{Glic+DHA}^{RID} - \frac{\text{Área}_{DHA}^{DAD 270}}{K_{DHA}^{DAD 270}} \cdot K_{DHA}^{RID}}{K_{Glic}^{RID}} \quad [2.4]$$

En la Figura 2.13 se muestran las rectas de calibrado, obtenidas todas ellas con un coeficiente de regresión superior a 0,999 y en la Tabla 2.9 se detallan los tiempos de retención de cada compuesto y las constantes de calibrado para el cálculo de la concentración mediante las ecuaciones [2.3] o [2.4], según corresponda.

Cabe señalar que a pesar de haber tenido en cuenta el gliceraldehído para el desarrollo del método de análisis, no se ha detectado en ningún experimento, probablemente debido a que la transformación en ácido glicérico se realiza en el interior de la célula, como se apuntaba en el esquema de la Figura 2.1.

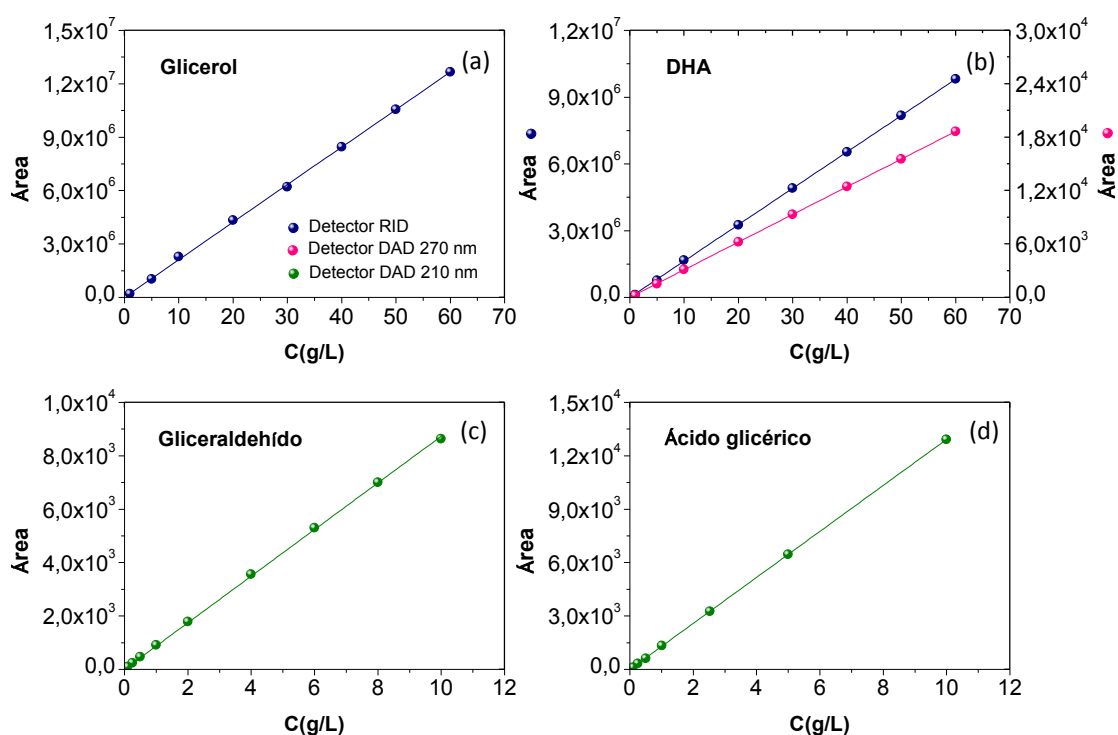


Figura 2.13. Rectas de calibrado para relacionar el área de pico y la concentración de cada compuesto: (a) glicerol, (b) DHA, (c) gliceraldehído y (d) ácido glicérico.

Tabla 2.9. Constantes de calibrado y tiempos de retención obtenidos para cada compuesto con el método de análisis propuesto.

Compuesto	Detector	λ (nm)	t_R (min)	$K_j^{Detector}$
Glicerol	RID	-	17,6	211137
DHA	RID	-	17,5	163470
	DAD	270	16,8	311
Gliceraldehído	DAD	210	15,3	873
Ácido glicérico	DAD	210	13,7	1292

2.5 MÉTODOS DE ESTIMACIÓN Y DE AJUSTE

En este apartado se describen los métodos de cálculo empleados para el desarrollo de la presente Tesis Doctoral en lo referente a la estimación de k_La , al cálculo de parámetros relevantes en el estudio del oxígeno, como son OTR, OUR y q_{O_2} , y a la obtención de modelos cinéticos descriptivos del proceso productivo en cuestión.

2.5.1 Estimación de k_La

En los procesos aerobios, como es el caso del proceso objeto de estudio en esta Tesis Doctoral, la transferencia de materia desde la fase gas hasta la fase líquida es un aspecto clave para satisfacer los requerimientos de oxígeno del microorganismo presente en el líquido. Habitualmente, la velocidad de transferencia de materia se define como el producto entre el gradiente de concentraciones y un coeficiente volumétrico de transferencia de materia conocido como k_La que, a su vez, es el producto entre el coeficiente de transferencia, k_L , y el área interfacial específica, a . Para su estimación existen en bibliografía numerosas correlaciones empíricas simplificadas basadas en variables tales como velocidad de agitación, velocidad superficial del gas, viscosidad en el caso de fluidos no-newtonianos, potencia suministrada por el agitador etc. (Özbek y Gayik, 2001; Galaction y col., 2004; Kapic y Heindel, 2006; Marques y col., 2009). Sin embargo, se observan discrepancias entre los resultados obtenidos a partir de las diferentes correlaciones empíricas y dichos valores con frecuencia distan de los valores experimentales (García-Ochoa y Gómez, 1998; Gogate y col., 2000). Este hecho puede ser debido a la gran influencia que presenta la geometría del dispositivo experimental (García-Ochoa y Gómez, 2005). Por lo tanto, dado que el desarrollo de una correlación empírica implica un gran esfuerzo experimental y no siempre conduce a buenas estimaciones, en este trabajo se ha optado por realizar una estimación teórica de k_La aplicando el método predictivo propuesto por García-Ochoa y Gómez (2004) para aquellos experimentos en los que no se ha podido determinar experimentalmente dicho coeficiente.

La estimación del coeficiente de transferencia de materia; k_L , se basa en la teoría de la penetración de Higbie, ampliamente aceptada para la descripción de la transferencia de materia gas-líquido (Kawase y col., 1987; Billet y Schultes, 1993; Kawase y Hashiguchi, 1996; Tobajas y col., 1999), que supone una difusión no

estacionaria de los elementos de la interfase. De este modo, el coeficiente de transferencia se puede calcular en función de la difusividad del oxígeno en el líquido en las condiciones experimentales (D_L) y del tiempo de exposición (t_e), según la ecuación [2.5].

$$k_L = 2 \cdot \sqrt{\frac{D_L}{\pi \cdot t_e}} \quad [2.5]$$

El tiempo de exposición puede considerarse como el tiempo que tarda una burbuja en desplazarse una longitud igual a su diámetro y se puede estimar de acuerdo con la teoría de Kolmogoroff sobre la turbulencia isotrópica, que particularizando para el caso de fluidos no newtonianos que siguen el modelo de Ostwald–de Waele, conduce a una expresión como la que se muestra en la ecuación [2.6], donde K es el índice de consistencia en el modelo de la ley de la potencia, ε es la velocidad de disipación local de energía, ρ es la densidad y n es el índice de flujo de la ley de la potencia.

$$t_e = \left(\frac{K}{\varepsilon \cdot \rho} \right)^{\frac{1}{(1+n)}} \quad [2.6]$$

Sustituyendo la ecuación [2.6] en la expresión [2.5] y considerando, como es el caso, que el fluido en cuestión es newtoniano ($n=1$ y $K=\mu$), se obtiene la siguiente expresión para el coeficiente de transporte:

$$K_L = 2 \cdot \sqrt{\frac{D_L}{\pi}} \cdot \left(\frac{\varepsilon \cdot \rho}{\mu} \right)^{\frac{1}{4}} \quad [2.7]$$

En la ecuación [2.7] todos los parámetros corresponden a propiedades físicas del fluido fácilmente medibles, a excepción de la velocidad de disipación de energía cercana a la interfase, ε , para cuyo cálculo se ha de asumir que se corresponde con la de la energía consumida en la interfase gas-líquido como consecuencia del contacto entre los elementos del líquido y las burbujas de gas. De este modo, la velocidad media de disipación de energía por unidad de masa para un tanque agitado puede calcularse según la ecuación [2.8], donde P_t es la potencia suministrada, T el diámetro del agitador y h la altura de líquido.

$$\varepsilon \approx \varepsilon_{med} = \frac{P_t}{\rho \cdot \frac{\pi}{4} \cdot T^2 \cdot h} \quad [2.8]$$

En sistemas aireados, la potencia suministrada puede calcularse a partir de la ecuación [2.9], propuesta por Michel y Miller (1962), donde P_0 es la potencia introducida por el agitador en sistemas no aireados, N es la velocidad de agitación, Q el caudal de aire y α y β son constantes que dependen del tipo de agitador y de la configuración del sistema de agitación. Así, para sistemas con doble turbina tipo Rushton, $\alpha = 1,224$ y $\beta = 0,432$; mientras que para sistemas con una única turbina Rushton, $\alpha = 0,783$ y $\beta = 0,459$ (Abrardi y col., 1988).

$$P_t = \alpha \cdot \left(\frac{P_0^2 \cdot N \cdot T^3}{Q^{0,56}} \right)^\beta \quad [2.9]$$

A su vez, la potencia suministrada en sistemas no aireados, P_0 , se puede determinar en función del número de potencia (N_p), que puede considerarse constante para regímenes turbulentos ($Re > 10000$) y es función del tipo de agitador y la geometría:

$$P_0 = N_p \cdot \rho \cdot N^3 \cdot T^5 \quad [2.10]$$

De este modo, es posible calcular k_L mediante la ecuación [2.7], previa determinación de los parámetros implicados por medio de las ecuaciones [2.8], [2.9] y [2.10].

En cuanto al área interfacial específica, a , depende fuertemente de las condiciones hidrodinámicas, la geometría del sistema y las propiedades físicas. Según diversos autores (Kawase y col., 1987; Tobajas y col., 1999) este parámetro puede calcularse a partir de del diámetro de burbuja, d_b , y de la fracción volumétrica del gas en el líquido o *hold-up* del gas, Φ , suponiendo burbujas esféricas:

$$a = \frac{6 \cdot \phi}{d_b} \quad [2.11]$$

El *hold-up* del gas puede estimarse a partir de la teoría de la turbulencia isotrópica considerando que el tamaño de las burbujas en régimen turbulento está afectado por la velocidad de agitación. Para configuraciones estándar, fuerzas viscosas

despreciables, como es el caso debido a la escasez de biomasa producida, y $10^3 \leq Re \leq 2 \cdot 10^5$, la expresión resultante se reduce a la ecuación [2.12] (Kudrewizki y Rabe, 1986), donde: V_s es la velocidad superficial del gas; g es la constante gravitacional; ρ_L es la densidad del líquido; ρ_G es la densidad del gas y σ es la tensión interfacial.

$$\frac{\Phi}{1-\Phi} = 0,819 \cdot \frac{V_s^{2/3} \cdot N^{2/5} \cdot T^{4/15}}{g^{1/3}} \cdot \left(\frac{\rho_L}{\sigma} \right)^{1/5} \cdot \left(\frac{\rho_L}{\rho_L - \rho_G} \right) \cdot \left(\frac{\rho_L}{\rho_G} \right)^{-1/15} \quad [2.12]$$

Asimismo, el diámetro medio de burbuja (d_b) puede estimarse mediante la ecuación propuesta por Bhavaraju y col. (1978) obtenida a partir del balance entre la presión dinámica ejercida por el flujo turbulento sobre la burbuja hasta su rotura y las fuerzas de resistencia en la interfase, principalmente tensión superficial, y considerando que el número adimensional de Weber se mantiene constante:

$$d_b = 0,7 \cdot \frac{\sigma^{0,6}}{\left(\frac{P_t}{V_L} \right)^{0,4} \cdot \rho_L^{0,2}} \cdot \left(\frac{\mu_L}{\mu_G} \right)^{0,1} \quad [2.13]$$

Una vez determinado el *hold-up* y el diámetro de burbuja aplicando las ecuaciones [2.12] y [2.13], respectivamente, se puede calcular el área interfacial específica por medio de la ecuación [2.11]. Este dato junto con el del coeficiente de transferencia, permite el cálculo de $k_L a$.

Los valores de las propiedades físicas de los fluidos del sistema (fase gas y fase líquida), las condiciones de operación seleccionadas y los parámetros geométricos de los biorreactores de tipo tanque agitado en los que se han llevado a cabo los distintos experimentos se muestran en la Tabla 2.10.

Tabla 2.10. Valores de las propiedades físicas, los parámetros geométricos y las condiciones de operación empleados para la estimación del coeficiente volumétrico de transferencia de materia, k_La .

	Parámetro	Biorreactor 2 L	Biorreactor 1 L
Propiedades físicas (a 30°C)	D_L (m ² /s)	$2 \cdot 10^{-9}$	
	μ_L (Kg/m·s)	$1,05 \cdot 10^{-3}$	
	μ_G (Kg/m·s)	$2 \cdot 10^{-5}$	
	σ (N/m)	0,064	
	ρ_L (Kg/m ³)	1001,78	
	ρ_G (Kg/m ³)	1,18	
Parámetros geométricos	T (m)	0,054	0,044
	D (m)	0,13	0,11
Condiciones de operación	V_S (m/s)	$2,5 \cdot 10^{-3}$	$8,8 \cdot 10^{-4}$
	N (rpm)	360	300-900
	N_P	9	4,5
	V_L (L)	2	0,5

2.5.2 Determinación experimental de OTR, k_La , OUR y q_{O_2}

Un estudio exhaustivo sobre el aporte de oxígeno y su consumo por parte del microorganismo en un biorreactor implica la determinación de parámetros como la velocidad de transferencia de oxígeno (OTR), la velocidad de consumo de oxígeno (OUR) y la velocidad específica de consumo de oxígeno (q_{O_2}) para poder extraer conclusiones acerca de los requerimientos de oxígeno del proceso.

El medidor de gases conectado a la salida del condensador del biorreactor (Figura 2.3) proporciona el valor del porcentaje de oxígeno contenido en esta corriente en cada momento (x_{O_2}). Asumiendo que el oxígeno se comporta como un gas ideal, se puede calcular su flujo molar (F_{O_2}) en la corriente de salida mediante la ecuación de estado de los gases ideales, en función de la temperatura (T), la presión (P) y el caudal de salida (Q), según la ecuación [2.14]. De este modo, se puede considerar que la

diferencia entre el flujo molar de oxígeno en la corriente de salida al comienzo del experimento ($F_{O_2}^0$) y a un tiempo determinado ($F_{O_2}^t$) equivale al flujo de oxígeno transferido al líquido, y por tanto, OTR puede calcularse directamente a partir de la ecuación [2.15]; en la cual, V corresponde al volumen de líquido. Con este dato y atendiendo a la definición de OTR, se puede calcular el valor experimental de $k_L a$ según la ecuación [2.16]; donde $C_{O_2}^*$ es la concentración de saturación de oxígeno en el caldo y C_{O_2} es la concentración de oxígeno disuelto en cada momento, medida experimentalmente gracias al electrodo polarográfico del que dispone el biorreactor. Cabe insistir en que la respuesta del electrodo se da en forma de porcentaje de oxígeno disuelto, correspondiendo el 100 % a la concentración de saturación de oxígeno en el caldo en las condiciones experimentales.

Asimismo, haciendo un balance de oxígeno en el caldo se puede calcular OUR por medio de la ecuación [2.17] y dividiendo dicho valor entre la concentración de biomasa (C_X) se obtiene la velocidad específica de consumo de oxígeno (ecuación [2.18]).

$$F_{O_2} = x_{O_2} \cdot \frac{P \cdot Q}{R \cdot T} \quad [2.14]$$

$$OTR = \frac{F_{O_2}^0 - F_{O_2}^t}{V_L} \quad [2.15]$$

$$k_L a = \left(\frac{OTR}{C_{O_2}^* - C_{O_2}} \right) \quad [2.16]$$

$$OUR = OTR - \frac{dC_{O_2}}{dt} \quad [2.17]$$

$$q_{O_2} = \frac{OUR}{C_X} \quad [2.18]$$

En aquellos experimentos en los que no se recogieron datos de la composición de oxígeno en la corriente de salida del biorreactor se ha empleado el método teórico descrito en el apartado anterior para estimar $k_L a$ y a partir de este valor calcular OTR por medio de la ecuación [2.16], lo que permite a su vez calcular OUR y q_{O_2} a partir de las ecuaciones [2.17] y [2.18], respectivamente.

2.5.3 Modelización cinética del proceso y método de ajuste

La modelización cinética del proceso consiste en formular modelos matemáticos a partir del planteamiento de una reacción o red de reacciones que describan las transformaciones que tienen lugar. Para ello, es necesario establecer una ecuación cinética para definir la velocidad de reacción, que puede nacer de hipótesis fenomenológicas o puede ser de naturaleza empírica.

Con la información anterior, se puede aplicar el método de las velocidades de producción para determinar la velocidad de producción de cada compuesto a partir del coeficiente estequiométrico del compuesto j en cada reacción i (ν_{ij}) y la velocidad de reacción r_i (García-Ochoa y col., 1993), según la ecuación [2.19].

$$R_j = \sum_{i=1}^N \nu_{ij} \cdot r_i \quad [2.19]$$

Dado que la velocidad de producción de un compuesto se define según la ecuación [2.20], la obtención de los parámetros del modelo requiere la resolución de un sistema de ecuaciones diferenciales (método diferencial).

$$R_j = \frac{dC_j}{dt} \quad [2.20]$$

Sin embargo, en este trabajo se dispone de datos integrales; esto es, datos de evolución de la concentración con el tiempo, y la aplicación del método diferencial conduce a mucho error matemático (García-Ochoa y col., 1992). Por lo tanto, es preferible llevar a cabo la integración de las ecuaciones (método integral) para proceder a su resolución, siendo imprescindible el acople de un algoritmo de integración numérica y un algoritmo de ajuste estadístico. Para ello, en esta Tesis Doctoral se ha empleado el *software* de cálculo Aspen Custom Modeler, escogiendo el método implícito de Euler con paso variable como herramienta para la integración numérica. Además, puesto que el ajuste a realizar es no lineal, se ha seleccionado el algoritmo NL2SOL (*non-linear least-squares solver*), que emplea como criterio de ajuste o función objetivo (F_{Obj}), la minimización de la suma del cuadrado de los residuos, según la ecuación [2.21].

$$F_{Obj} = \sum_{j=1}^N \frac{(C_j^{exp} - C_j^{cal})^2}{C_j^{exp}} \rightarrow \text{mínimo} \quad [2.21]$$

Para evaluar la bondad del modelo una vez comprobado que los parámetros obtenidos cumplen los criterios físicos establecidos (por ejemplo, valores positivos para las constantes cinéticas), se atiende a parámetros estadísticos como los que se describen a continuación.

F-Fisher

Este parámetro estadístico se define según la ecuación [2.22] e indica el grado de adecuación del modelo para describir los valores observados de la variable medida. Para ello, este valor calculado se compara con el valor tabulado para el 95 % de confianza. El criterio establece que el valor calculado debe ser mayor que el valor tabulado.

$$F - Fisher = \frac{\sum_{i=1}^N \frac{(C_j^{cal})^2}{Pa}}{\sum_{i=1}^N \frac{SRC}{Nd - Pa}} \quad [2.22]$$

donde: Pa es el número de parámetros, Nd el número total de datos experimentales y SRC la suma de residuos al cuadrado, definida por la ecuación [2.23].

$$SRC = \sum_{j=1}^N (C_j^{exp} - C_j^{cal})^2 \quad [2.23]$$

Error residual medio al cuadrado (ERMC)

El error residual medio al cuadrado se define según la ecuación [2.24] y tiene en cuenta la diferencia entre los valores experimentales y los predichos por el modelo (SRC), el número de datos experimentales (Nd) y el número de parámetros del modelo (Pa). Este valor debe ser lo más bajo posible para indicar pocas discrepancias entre los valores experimentales y los predichos.

$$ERMC = \sqrt{\frac{SRC}{Nd - Pa}} \quad [2.24]$$

Porcentaje de variación explicada (VE)

Este parámetro estadístico expresa la bondad del modelo para predecir tendencias. Se define según la ecuación [2.25], considerando que el parámetro de heterocedasticidad es la unidad, es decir, asumiendo que la varianza de las perturbaciones es constante a lo largo de las observaciones (homocedasticidad). El poder explicativo del modelo será mayor cuanto más se acerque el parámetro al 100 %.

$$VE(\%) = 100 \cdot \left(1 - \frac{\sum_{j=1}^N \frac{(C_j^{exp} - C_j^{cal})^2}{C_j^{cal}}}{\sum_{j=1}^N \frac{(C_j^{exp} - \bar{C}_j^{exp})^2}{C_j^{cal}}} \right) \quad [2.25]$$

donde:

$$\bar{C}_j^{exp} = \frac{\sum_{j=1}^N \frac{C_j^{exp}}{(C_j^{cal})^{1/2}}}{\sum_{j=1}^N \frac{1}{(C_j^{cal})^{1/2}}} \quad [2.26]$$

2.6 BIBLIOGRAFÍA

- Abrardi, V., Rovero, G., Sicardi, S., Baldi, G., Conti, R. 1988. Sparged vessels agitated by multiple turbines.
- Bhavaraju, S.M., Russell, T., Blanch, H. 1978. The design of gas sparged devices for viscous liquid systems. *AIChE Journal*, **24**(3), 454-466.
- Billet, R., Schultes, M. 1993. Predicting mass transfer in packed columns. *Chemical engineering & technology*, **16**(1), 1-9.
- Bories, A., Claret, C., Soucaille, P. 1991. Kinetic-study and optimization of the production of dihydroxyacetone from glycerol using *Gluconobacter oxydans*. *Process Biochemistry*, **26**(4), 243-248.
- Claret, C., Salmon, J.M., Romieu, C., Bories, A. 1994. Physiology of *Gluconobacter oxydans* during dihydroxyacetone production from glycerol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **41**(3), 359-365.
- De Muynck, C., Pereira, C.S., Naessens, M., Parmentier, S., Soetaert, W., Vandamme, E.J. 2007. The genus *Gluconobacter oxydans*: Comprehensive overview of biochemistry and biotechnological applications. *Critical reviews in biotechnology*, **27**(3), 147-171.
- Deppenmeier, U., Hoffmeister, M., Prust, C. 2002. Biochemistry and biotechnological applications of *Gluconobacter* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **60**(3), 233-242.
- Galaction, A.I., Cascaval, D., Oniscu, C., Turnea, M. 2004. Prediction of oxygen mass transfer coefficients in stirred bioreactors for bacteria, yeasts and fungus broths. *Biochemical Engineering Journal*, **20**(1), 85-94.
- Garcia-Ochoa, F., Gomez, E. 1998. Mass transfer coefficient in stirred tank reactors for xanthan gum solutions. *Biochemical Engineering Journal*, **1**(1), 1-10.
- García-Ochoa, F., Gómez, E. 2004. Theoretical prediction of gas-liquid mass transfer coefficient, specific area and hold-up in sparged stirred tanks. *Chemical Engineering Science*, **59**(12), 2489-2501.

- García-Ochoa, F., Romero, A., Santos, V., Rodriguez, C. 1993. Studies of the use of the differential method in the determination of kinetic models for complex reactions. *International Chemical Engineering*, **33**(4).
- García-Ochoa, F., Romero, A., Santos, V.E. 1992. Comparison of methods for determining the kinetic parameters in complex reactions. *International Chemical Engineering*, **32**, 538-551.
- Garcia-Ochoa, F., Gomez, E. 2005. Prediction of gas-liquid mass transfer coefficient in sparged stirred tank bioreactors. *Biotechnology and bioengineering*, **92**(6), 761-772.
- Garrity, G., Staley, J.T., Boone, D.R., De Vos, P., Goodfellow, M., Rainey, F.A., Schleifer, K.H., Brenner, D.J., Krieg, N.R. 2006. *Bergey's manual® of systematic bacteriology: Volume two: The proteobacteria*. Springer Science & Business Media.
- Gogate, P.R., Beenackers, A.A., Pandit, A.B. 2000. Multiple-impeller systems with a special emphasis on bioreactors: A critical review. *Biochemical Engineering Journal*, **6**(2), 109-144.
- Gupta, A., Singh, V.K., Qazi, G.N., Kumar, A. 2001. *Gluconobacter oxydans*: Its biotechnological applications. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, **3**(3), 445-456.
- Habe, H., Fukuoka, T., Morita, T., Kitamoto, D., Yakushi, T., Matsushita, K., Sakaki, K. 2010. Disruption of the membrane-bound alcohol dehydrogenase-encoding gene improved glycerol use and dihydroxyacetone productivity in *Gluconobacter oxydans*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **74**(7), 1391-1395.
- Hu, Z.-C., Zheng, Y.-G., Shen, Y.-C. 2011. Use of glycerol for producing 1,3-dihydroxyacetone by *Gluconobacter oxydans* in an airlift bioreactor. *Bioresource Technology*, **102**(14), 7177-7182.
- Kapic, A., Heindel, T.J. 2006. Correlating gas-liquid mass transfer in a stirred-tank reactor. *Chemical Engineering Research and Design*, **84**(3), 239-245.

- Kawase, Y., Halard, B., Moo-Young, M. 1987. Theoretical prediction of volumetric mass transfer coefficients in bubble columns for newtonian and non-newtonian fluids. *chemical Engineering science*, **42**(7), 1609-1617.
- Kawase, Y., Hashiguchi, N. 1996. Gas—liquid mass transfer in external-loop airlift columns with newtonian and non-newtonian fluids. *The Chemical Engineering Journal and The Biochemical Engineering Journal*, **62**(1), 35-42.
- Keliang, G., Dongzhi, W. 2006. Asymmetric oxidation by *Gluconobacter oxydans*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **70**(2), 135-139.
- Kudrewizki, F., Rabe, P. 1986. Model of the dissipation of mechanical energy in gassed stirred tanks. *Chemical engineering science*, **41**(9), 2247-2252.
- Ma, L., Lu, W., Xia, Z., Wen, J. 2010. Enhancement of dihydroxyacetone production by a mutant of *Gluconobacter oxydans*. *Biochemical Engineering Journal*, **49**(1), 61-67.
- Marques, D.d.A.V., Torres, B.R., Porto, A.L.F., Pessoa-Júnior, A., Converti, A. 2009. Comparison of oxygen mass transfer coefficient in simple and extractive fermentation systems. *Biochemical engineering journal*, **47**(1), 122-126.
- Michel, B.J., Miller, S. 1962. Power requirements of gas-liquid agitated systems. *AIChE Journal*, **8**(2), 262-266.
- Nabe, K., Izuo, N., Yamada, S., Chibata, I. 1979. Conversion of glycerol to dihydroxyacetone by immobilized whole cells of *Acetobacter xylinum*. *Applied and Environmental Microbiology*, **38**(6), 1056-1060.
- Olijve, W., Kok, J. 1979. An analysis of the growth of *Gluconobacter oxydans* in chemostat cultures. *Archives of Microbiology*, **121**(3), 291-297.
- Özbek, B., Gayik, S. 2001. The studies on the oxygen mass transfer coefficient in a bioreactor. *Process Biochemistry*, **36**(8–9), 729-741.
- Prust, C., Hoffmeister, M., Liesegang, H., Wiezer, A., Fricke, W.F., Ehrenreich, A., Gottschalk, G., Deppenmeier, U. 2005. Complete genome sequence of the acetic acid bacterium *Gluconobacter oxydans*. *Nature Biotechnology*, **23**(2), 195-200.

- Sato, S., Morita, N., Kitamoto, D., Yakushi, T., Matsushita, K., Habe, H. 2013. Change in product selectivity during the production of glyceric acid from glycerol by *Gluconobacter* strains in the presence of methanol. *AMB Express*, **3**(1), 20-20.
- Svitel, J., Sturdik, E. 1994. Product yield and by-product formation in glycerol conversion to dihydroxyacetone by *Gluconobacter oxydans*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **78**(5), 351-355.
- Tobajas, M., Garcia-Calvo, E., Siegel, M., Apitz, S. 1999. Hydrodynamics and mass transfer prediction in a three-phase airlift reactor for marine sediment biotreatment. *Chemical Engineering Science*, **54**(21), 5347-5354.
- Yamada, S., Nabe, K., Izuo, N., Chibata, I. 1979. Studies on aerobic fermentation .5. Enzymatic production of dihydroxyacetone by *Acetobacter suboxydans* ATCC-621. *Journal of Fermentation Technology*, **57**(3), 221-226.

CAPÍTULO 3.

ESTUDIO DEL MEDIO DE PRODUCCIÓN DE DHA

CAPÍTULO 3.

ESTUDIO DEL MEDIO DE PRODUCCIÓN DE DHA

Índice

3.1	ANTECEDENTES	109
3.2	ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN DEL MEDIO	114
3.2.1	Resultados experimentales	115
3.2.2	Discusión de los resultados	119
3.2.3	Ensayo de actividad enzimática.....	124
3.3	ESTUDIO DE LA INHIBICIÓN POR SUSTRATO	129
3.3.1	Resultados experimentales	129
3.3.2	Discusión de los resultados	133
3.4	ESTUDIO DE LA INHIBICIÓN POR PRODUCTO	145
3.4.1	Resultados experimentales	145
3.4.2	Discusión de los resultados	148
3.5	EMPLEO DE GLICEROL CRUDO	155
3.5.1	Resultados experimentales	157
3.5.2	Discusión de los resultados	160
3.6	BIBLIOGRAFÍA CITADA	170

CAPÍTULO 3.

ESTUDIO DEL MEDIO DE PRODUCCIÓN DE DHA

Siguiendo la metodología expuesta en la introducción para el desarrollo de un proceso biotecnológico, la primera etapa corresponde al estudio del medio de cultivo. Se trata de una etapa crucial, ya que la composición del medio va a influir decisivamente tanto en el crecimiento de la bacteria y en la producción del producto, como en la economía del proceso.

3.1 ANTECEDENTES

Desde el punto de vista de la simplificación de las etapas posteriores de aislamiento y purificación del producto y de la robustez del proceso, es recomendable el uso de medios sintéticos, aunque no siempre es factible (Zhang y Greasham, 1999).

En los diferentes estudios consultados sobre los requerimientos nutricionales de *G. oxydans*, no se ha hallado un consenso sobre cuáles son los nutrientes esenciales para el crecimiento de esta bacteria. Según uno de los primeros estudios (Underkofler y col., 1943), el medio debe contener ácido pantoténico, ácido p-aminobenzoico y ácido nicotínico, además de una fuente de carbono apropiada, sales inorgánicas y nitrógeno orgánico para asegurar un buen crecimiento. En otro trabajo muy posterior (Wethmar y Deckwer, 1999), se afirma que además de las tres vitaminas anteriores, es necesaria la adición de los aminoácidos serina y glutamina, lo que permite reducir considerablemente la cantidad de nitrógeno orgánico requerido en la formulación del medio. Sin embargo, otros autores han demostrado que *G. oxydans* es capaz de sintetizar todos los aminoácidos y de crecer en un medio con amonio como única fuente de nitrógeno (Belly y Claus, 1972; Gossele y col., 1981).

No obstante, en lo que respecta a la producción de DHA, los estudios recientes realizados con fuentes de nitrógeno inorgánicas, tales como $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KNO_3 , carbamida, NH_4Cl , y NH_4NO_3 , no han dado buenos resultados (Hu y col., 2010a; Liu y col., 2013). De hecho, todos los medios reportados en bibliografía para la producción de DHA con células en crecimiento a partir de glicerol incluyen fuentes complejas (ver Tabla 3.1). Esto puede ser debido a que ciertos nutrientes presentes en el extracto de

levadura son necesarios para la producción de la enzima glicerol deshidrogenasa, responsable de la biotransformación, tal y como afirman varios autores (Flickinger y Perlman, 1977; Raska y col., 2007).

De todas las fuentes complejas estudiadas en bibliografía (licor de maceración de maíz, extracto de malta, extracto de carne, extracto de levadura, peptona y triptona), las que mejores resultados mostraron en términos de producción de DHA fueron el licor de maceración de maíz y el extracto de levadura (Yamada y col., 1979a; Yamada y col., 1979b; Wei y col., 2007a; Liu y col., 2013), aunque en comparación con la peptona, no se observaron grandes diferencias empleando *G. oxydans* como biocatalizador (Hu y col., 2010a).

Además de la fuente de nitrógeno orgánico, muchos de los medios consultados contienen sales inorgánicas. La adición de CaCl_2 parece tener un efecto positivo en el crecimiento, probablemente debido a la formación de un quelato que disminuye el efecto inhibitorio de la DHA (Wethmar y Deckwer, 1999). Otro compuesto ampliamente utilizado es el CaCO_3 debido a su capacidad para neutralizar los ácidos producidos como subproductos (Silberbach y col., 2003). Además, sales como $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, FeCl_3 , K_2HPO_4 , KH_2PO_4 y MgSO_4 aparecen con frecuencia en la formulación de los medios, tal y como se puede apreciar en la Tabla 3.1.

Por otro lado, según varios autores, el glicerol ejerce un efecto inhibitorio tanto del crecimiento como de la producción de DHA, debido a que afecta a la permeabilidad de la membrana y, por tanto, limita la entrada de nutrientes a la célula (Bories y col., 1991; Claret y col., 1992). Asimismo, Ohrem y Voss (1996) sostienen la hipótesis de que el glicerol en altas concentraciones provoca una elongación de la célula y esta deformación interfiere directamente en la división celular, provocando la inhibición del crecimiento.

En cualquier caso, existe un acuerdo generalizado en lo que respecta a la inhibición del crecimiento debido a altas concentraciones de glicerol, pero las causas no están claras (Bories y col., 1991; Claret y col., 1992; Ohrem y Voss, 1996; Stasiak-Rozanska y col., 2014). No obstante, no ocurre lo mismo con el fenómeno de inhibición de la producción: hay estudios que rebaten la afirmación de que el glicerol inhibe la producción de DHA; según Ohrem y Merck (1996), la disminución de la velocidad de producción de DHA con el aumento de la concentración de glicerol podría explicarse

por la disminución de la actividad respiratoria de la célula a causa de la parada del crecimiento.

Además de la inhibición por sustrato, también se ha reportado la existencia del fenómeno de inhibición por producto que afecta tanto al crecimiento bacteriano, como a la propia producción de DHA. Así, se ha comprobado que la velocidad de crecimiento disminuye a medida que aumenta la concentración de DHA, aunque la inhibición total del crecimiento no bloquea la producción de DHA (Bories y col., 1991; Claret y col., 1992; Claret y col., 1994; Stasiak-Rozanska y col., 2014). Este efecto sobre el crecimiento puede deberse a que la DHA afecta al mecanismo de transporte del glicerol al interior de la célula, a causa de su alta reactividad con las proteínas (Bories y col., 1991; Claret y col., 1994).

Precisamente el fenómeno de inhibición de la producción podría estar ligado al hecho de que la DHA puede reaccionar con los aminoácidos presentes en el centro activo de la enzima glicerol deshidrogenasa, según proponen Claret y col. (1993). En estudios previos realizados por Nabe y col. (1979) ya se había afirmado que altas concentraciones de DHA podrían afectar a la estabilidad de la enzima glicerol deshidrogenasa. Esta hipótesis fue corroborada más tarde por Claret y col. (1994) mediante la medición de la actividad de la enzima en medios con concentraciones crecientes de DHA, observándose una disminución de la actividad con la concentración de DHA.

Con el objetivo de evitar los efectos inhibitorios, tanto por producto, como por sustrato, se han propuesto distintas alternativas en cuanto al modo de operar. De esta manera, varios autores apuestan por realizar el proceso en dos etapas: una etapa previa de crecimiento empleando manitol como sustrato para maximizar la actividad enzimática, seguida de una segunda etapa de producción de DHA a partir de glicerol (Bories y col., 1991; Hu y col., 2011). Además del manitol, el sorbitol también parece favorecer el crecimiento celular, la formación de la enzima glicerol deshidrogenasa y la producción de DHA (Yamada y col., 1979a; Bauer y col., 2005). Por esta razón, algunos autores han optado por emplear sorbitol como cosustrato en la producción de DHA y no sólo en la etapa de obtención del inóculo (Ohrem y Voss, 1996; Hekmat y col., 2003; Bauer y col., 2005; Bauer y Hekmat, 2006; Wei y col., 2007b).

Tabla 3.1. Composición de los medios de producción de DHA con *G.oxydans* hallados en bibliografía.

Medio	Clasificación funcional	Compuesto	Concentración (g/L)	Ref.
1	Fuente de carbono	Glicerol	50	(Claus y col., 1975)
	Fuente de nitrógeno orgánico	Extracto de levadura	10	
		Peptona	10	
	Tampón	Ácido cis,cis,cis,cis-1,2,3,4-ciclopentanotetracarboxílico	12,5	
	Antiespumante	Silicona GE-60	1	
2	Fuente de carbono	Glicerol	200	(Yamada y col., 1979b)
	Fuente de nitrógeno orgánico	Licor de maceración de maíz	30	
	Fuente de nitrógeno inorgánico	Fumarato de amonio (NH ₄ OOC-CH=CH-COONH ₄)	3	
	Tampón	CaCO ₃	10	
3	Fuente de carbono	Glicerol	30	(Bories y col., 1991)
		Manitol	25	
	Fuente de nitrógeno orgánico	Extracto de levadura	10	
4	Fuente de carbono	Glicerol	50	(Claret y col., 1993)
	Fuente de nitrógeno orgánico	Extracto de levadura	10	
5	Fuente de carbono	Glicerol	30	(Wethmar y Deckwer, 1999)
	Fuente de nitrógeno orgánico	Extracto de levadura	0,5	
	Fuente de nitrógeno inorgánico	(NH ₄) ₂ SO ₄	1,5	
	Sales inorgánicas	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,25	
		FeCl ₃	0,005	
		NaEDTA	0,013	
		CaCl ₂	1,25	
	Vitaminas	Pantotenato de calcio	0,002	
		Ácido p-aminobenzóico	0,002	
		Ácido nicotínico	0,003	
	Aminoácidos	L-glutamina	0,09	
		L-serina	0,028	
	Tampón	K ₂ HPO ₄	0,1	
		KH ₂ PO ₄	0,9	
6	Fuente de carbono	Glicerol	10-80	(Hekmat y col., 2003)
	Fuente de nitrógeno orgánico	Extracto de levadura	2,5	
	Fuente de nitrógeno inorgánico	(NH ₄) ₂ SO ₄	2	
	Sales inorgánicas	MgSO ₄ ·7H ₂ O	1	
		EDTA-Na (Titriplex III)	0,013	
		FeCl ₃	0,005	
	Tampón	KH ₂ PO ₄	0,9	
		K ₂ HPO ₄	0,1	

Medio	Clasificación funcional	Compuesto	Concentración (g/L)	Ref.
7	Fuente de carbono	Glicerol	10-20	(Bauer y col., 2005)
		Sorbitol	10	
	Fuente de nitrógeno orgánico	Extracto de levadura	2,5	
		(NH ₄) ₂ SO ₄	2	
	Sales inorgánicas	CaCl ₂	1,5	
		MgSO ₄ · 7 H ₂ O	1	
	Tampón	KH ₂ PO ₄	0,9	
8	Fuente de carbono	Glicerol	50	(Wang y col., 2006)
		Extracto de levadura	5	
	Fuente de nitrógeno orgánico	Peptona	3	
		CaCO ₃	2	
9	Fuente de carbono	Glicerol	10	(Wei y col., 2007a)
	Fuente de nitrógeno orgánico	Azúcares reducidos procedentes del hidrolizado de harina de maíz	80	
		Licor de maceración de maíz	25	
10	Fuente de carbono	Glicerol	60	(Ma y col., 2010)
	Fuente de nitrógeno orgánico	Extracto de levadura	10	
		K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	2,62	
		(NH ₄) ₂ SO ₄	2	
		MgSO ₄ ·7H ₂ O	1,12	
		MnSO ₄ ·H ₂ O	0,56	
		CaCl ₂	1,25	
11	Tampón	CaCO ₃	2,5	(Hu y col., 2010b)
	Fuente de carbono	Glicerol	20	
	Fuente de nitrógeno orgánico	Extracto de levadura	5	
		K ₂ HPO ₄	0,5	
12	Sales inorgánicas	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1	(Habe y col., 2010)
	Fuente de carbono	Glicerol	100-250	
		Polipeptona	10	
	Fuente de nitrógeno orgánico	Extracto de levadura	1	
13	Sales inorgánicas	MgSO ₄ ·7H ₂ O	1	(Li y col., 2010b)
	Tampón	KH ₂ PO ₄	0,9	
		K ₂ HPO ₄	0,1	
	Fuente de carbono	Glicerol	80	
13	Fuente de nitrógeno orgánico	Extracto de levadura	20	(Li y col., 2010b)
		(NH ₄) ₂ SO ₄	5	
	Sales inorgánicas	KH ₂ PO ₄	1,5	
		MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,5	

En vista de los antecedentes expuestos anteriormente, se ha considerado de interés la realización de un estudio sobre la cantidad óptima de fuente compleja a añadir en el medio, así como el análisis del efecto tanto de la concentración de glicerol como de la concentración de DHA sobre la velocidad de producción, para poder evaluar de esta forma los efectos de inhibición por sustrato y producto, respectivamente. Por lo tanto, en este Capítulo se va a abordar en primer lugar el estudio de la composición del medio de cultivo y en segundo lugar, el estudio de los fenómenos de inhibición por sustrato y producto para establecer las limitaciones que el sistema impone en términos de concentración de sustrato. Por último, se va a evaluar la posibilidad de emplear glicerol crudo como sustrato carbonado para la producción de DHA.

3.2 ESTUDIO DE LA COMPOSICIÓN DEL MEDIO

En este apartado se va a llevar a cabo el estudio de la influencia de la composición del medio de cultivo en la producción. Dado que en bibliografía se ha reportado que no es posible sustituir las fuentes de nitrógeno complejas por fuentes inorgánicas, y que aquéllas que mejores resultados arrojan son el extracto de levadura y la peptona, se va a evaluar su efecto en la producción de DHA.

Por otro lado, no se contempla el estudio de la adición de cosustratos porque se pretende evaluar exclusivamente el efecto del glicerol sobre la producción de DHA. Además, los cosustratos sugeridos en la bibliografía originan diferentes productos finales (fructosa a partir de manitol y sorbosa a partir de sorbitol) que van a interferir en la purificación posterior de la DHA (Yamada y col., 1979b). Del mismo modo, tampoco se ha considerado de interés la adición extra de sales inorgánicas porque éstas ya están presentes tanto en la peptona como en el extracto de levadura, y en bibliografía hay numerosos ejemplos de medios que prescinden de las sales con buenos resultados experimentales en términos de producción (medios 1, 2, 3, 4 y 8 de la Tabla 3.1).

Los experimentos se han llevado a cabo en matraz *Erlenmeyer* a 200 rpm y 30 °C. El medio de referencia seleccionado está basado en el que propone la CECT (Colección Española de Cultivos Tipo) para el crecimiento de *G. oxydans*, pero sustituyendo la fuente de carbono propuesta (manitol) por glicerol. Así, la composición del medio de partida es la siguiente: 25 g/L de glicerol, 5g/L de extracto de levadura y 3 g/L de peptona. En primer lugar, se ha estudiado el efecto que tiene la peptona sobre la producción y el crecimiento y en segundo lugar, se ha estudiado cuál es la

concentración mínima de extracto de levadura requerida en el proceso. La planificación experimental se muestra en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2. Planificación experimental para el estudio del medio de cultivo.

Experimento	Composición del medio		
	Glicerol (g/L)	Peptona (g/L)	Extracto de Levadura (g/L)
5YE3Pep	25	3	5
5YE	25	0	5
2,5YE	25	0	2,5
1,5YE	25	0	1,5
0,5YE	25	0	0,5
0,25YE	25	0	0,25
0YE	25	0	0 ¹

¹ El medio contiene trazas de fuente compleja que proceden del inóculo.

3.2.1 Resultados experimentales

Los resultados correspondientes a los experimentos planteados en la Tabla 3.2 se muestran en las Tablas 3.3 a 3.9. Para cada experimento se ha medido la evolución de las concentraciones de glicerol, DHA, biomasa, ácido glicérico y el pH. Puesto que el inóculo arrastra productos de la biotransformación, principalmente DHA y ácido glicérico (GA), los compuestos producidos en cada experimento (C_{DHA} y C_{GA}) se calculan como la diferencia entre la concentración del compuesto presente en el caldo a un tiempo dado (C_j^t) y la concentración al inicio del experimento (C_j^0), de acuerdo con las siguientes ecuaciones.

$$C_{DHA}(t) = C_{DHA}^t - C_{DHA}^0 \quad [3.1]$$

$$C_{GA}(t) = C_{GA}^t - C_{GA}^0 \quad [3.2]$$

Tabla 3.3. Resultados del experimento 5YE3Pep (5 g/L de extracto de levadura, 3 g/L de peptona). Condiciones: 30 °C, 200 rpm, pH libre, 20 % v/v inóculo.

Tiempo (h)	Biomasa (g/L)	pH	Glicerol (g/L)	DHA producida (g/L)	Ácido glicérico producido (g/L)
0	0,12	6,70	24,70	0,00	0,00
2	0,13	6,57	22,87	1,66	0,12
4	0,21	6,37	20,74	3,76	-
6	0,34	6,12	17,67	6,19	-
8	0,57	5,57	15,14	8,28	-
9	0,72	5,27	13,93	9,50	0,67
15	0,82	4,81	3,69	18,98	-
17	0,82	4,75	2,13	20,19	1,43
19	0,82	4,71	0,31	22,03	1,60
21	0,80	4,68	0,22	21,98	1,67
24	0,78	4,74	0,34	21,86	-
26	0,84	4,63	0,24	21,94	-
28	0,76	4,76	0,18	21,63	-
30	0,75	4,77	0,36	22,26	-
32	0,83	4,72	0,12	22,69	1,80
51	0,75	4,67	0,16	22,75	1,92

Tabla 3.4. Resultados del experimento 5YE (5 g/L de extracto de levadura). Condiciones: 30 °C, 200 rpm, pH libre, 20 % v/v inóculo.

Tiempo (h)	Biomasa (g/L)	pH	Glicerol (g/L)	DHA producida (g/L)	Ácido glicérico producido (g/L)
0	0,12	6,81	24,80	0,00	0,00
2	0,17	6,63	23,25	0,76	0,03
4	0,30	6,23	19,90	3,80	0,14
7	0,38	5,31	16,23	6,55	0,31
8	0,36	5,57	15,69	7,82	0,46
11	0,35	5,26	10,41	12,80	0,66
15	0,32	5,12	8,53	14,72	0,79
18	0,31	4,97	4,07	18,53	0,87
19	0,32	4,88	2,59	19,62	0,92
23	0,33	4,84	0,13	22,37	0,97
24	0,38	4,99	0,00	22,65	1,02
26	0,35	5,01	0,00	22,28	1,06
28	0,37	4,88	0,00	22,18	1,08
30	0,38	4,93	0,00	22,02	1,10
53	0,38	4,68	0,00	22,94	1,12

Tabla 3.5. Resultados del experimento 2,5YE (2,5 g/L de extracto de levadura). Condiciones: 30 °C, 200 rpm, pH libre, 20 % v/v inóculo.

Tiempo (h)	Biomasa (g/L)	pH	Glicerol (g/L)	DHA producida (g/L)	Ácido glicérico producido (g/L)
0	0,12	6,81	23,90	0,00	0,00
2	0,18	6,26	22,96	0,26	0,05
4	0,23	5,79	21,01	2,55	0,21
7	0,23	5,43	16,91	6,06	0,28
8	0,23	5,38	16,86	6,32	0,33
11	0,24	5,14	11,43	11,44	-
15	0,23	4,93	9,12	13,90	-
18	0,20	4,79	5,92	17,46	-
19	0,20	4,70	4,85	18,16	-
22,5	0,20	4,69	1,40	21,48	-
24	0,23	4,51	0,25	23,20	0,60
25,5	0,24	4,78	0,07	21,94	-
28	0,25	4,74	0,02	22,60	-
30	0,26	4,70	0,03	22,42	-
53	0,28	4,61	0,01	22,53	-

Tabla 3.6. Resultados del experimento 1,5YE (1,5 g/L de extracto de levadura). Condiciones: 30 °C, 200 rpm, pH libre, 20 % v/v inóculo.

Tiempo (h)	Biomasa (g/L)	pH	Glicerol (g/L)	DHA producida (g/L)	Ácido glicérico producido (g/L)
0	0,12	6,29	24,72	0,00	0,00
2	0,17	6,09	23,09	1,56	0,03
4	0,21	5,71	20,70	3,66	0,08
6	0,20	5,42	17,88	6,25	0,13
8	0,19	5,20	17,25	7,66	0,23
9,5	0,19	5,16	13,96	9,92	0,31
15	0,17	4,63	8,68	14,97	0,37
17	0,17	4,77	6,65	17,00	0,42
19	0,19	4,43	5,25	18,47	0,41
22	0,18	4,64	2,45	20,67	0,44
24	0,22	4,59	0,64	22,61	0,47
26	0,22	4,65	0,16	23,08	0,46
28	0,22	4,57	0,20	23,15	0,48
31	0,22	4,62	0,15	23,55	0,48
49	0,23	4,55	0,12	24,04	0,47
52	0,22	4,60	0,11	23,87	0,49

Tabla 3.7. Resultados del experimento 0,5YE (0,5 g/L de extracto de levadura). Condiciones: 30 °C, 200 rpm, pH libre, 20 % v/v inóculo.

Tiempo (h)	Biomasa (g/L)	pH	Glicerol (g/L)	DHA producida (g/L)	Ácido glicérico producido (g/L)
0	0,12	6,41	24,68	0,00	0,00
2	0,19	6,00	22,83	1,59	0,02
4	0,20	5,78	21,34	3,59	0,05
6	0,18	5,38	18,69	5,62	0,14
8	0,19	5,16	16,59	8,31	0,19
9,5	0,18	5,04	14,67	9,71	0,21
15	0,18	4,85	8,79	15,57	0,31
17	0,17	4,75	6,97	17,26	0,34
19	0,17	4,65	5,46	18,75	0,36
21,5	0,18	4,62	3,57	20,49	0,37
24	0,20	4,61	1,78	21,80	0,39
26	0,20	4,54	0,71	22,88	0,41
28	0,20	4,53	0,62	22,90	0,42
30	0,21	4,60	0,27	23,13	0,42
32	0,21	4,48	0,28	23,49	0,44
48	0,22	4,51	0,18	23,45	0,45

Tabla 3.8. Resultados del experimento 0,25YE (0,25 g/L de extracto de levadura). Condiciones: 30 °C, 200 rpm, pH libre, 20 % v/v inóculo.

Tiempo (h)	Biomasa (g/L)	pH	Glicerol (g/L)	DHA producida (g/L)	Ácido glicérico producido (g/L)
0	0,11	6,03	27,99	0,00	0,00
2	0,17	5,77	25,94	1,91	0,08
4	0,17	5,41	21,90	3,50	0,11
6	0,18	5,19	19,57	5,93	0,13
8	0,15	5,03	16,46	7,64	0,15
9,5	0,18	4,82	14,64	10,55	0,18
15	0,16	4,74	8,23	14,34	0,21
17	0,17	4,77	6,82	16,04	0,24
19	0,16	4,57	4,84	17,89	0,25
22	0,18	4,61	2,76	21,12	0,29
24	0,17	4,51	1,82	21,16	0,26
26	0,17	4,45	1,55	21,44	0,28
29	0,18	4,43	0,50	22,92	0,29
49	0,18	4,36	0,13	23,37	0,30

Tabla 3.9. Resultados del experimento 0YE (0 g/L de extracto de levadura).
Condiciones: 30 °C, 200 rpm, pH libre, 20 % v/v inóculo.

Tiempo (h)	Biomasa (g/L)	pH	Glicerol (g/L)	DHA producida (g/L)	Ácido glicérico producido (g/L)
0	0,10	5,86	24,26	0,00	0,00
2	0,17	5,54	22,24	1,80	0,03
4	0,16	5,19	20,64	3,40	0,04
6	0,15	5,08	18,77	5,47	0,05
8	0,14	4,98	16,69	7,47	0,06
9,5	0,15	4,86	14,40	9,39	0,07
15	0,15	4,68	10,03	13,67	0,13
17	0,15	4,61	9,16	14,76	0,15
19	0,15	4,52	6,81	16,85	0,17
22	0,16	4,45	5,42	18,14	0,19
24	0,17	4,48	1,29	21,83	0,19
26	0,16	4,41	1,76	21,69	0,20
29	0,16	4,39	0,84	22,87	0,21
49	0,16	4,29	0,10	24,09	0,22

3.2.2 Discusión de los resultados

En la Figura 3.1 se muestra la evolución de las concentraciones de glicerol, DHA, ácido glicérico y biomasa, así como la evolución del pH a lo largo del tiempo para las distintas concentraciones de fuente compleja estudiadas.

Cabe destacar que en el experimento con mayor concentración total de fuente compleja (5YE3Pep), el glicerol se agota aproximadamente 9 horas antes que en el experimento sin adición de ninguna fuente compleja (0YE). Sin embargo, la concentración final de producto alcanzada es prácticamente idéntica en todos los experimentos, independientemente de la cantidad de nutrientes aportada.

Por otro lado, se observa que a medida que disminuye la cantidad de fuente compleja empleada, también disminuye la formación de subproducto, responsable de la acidificación del medio, y con ello, se suaviza la caída del pH. No obstante, el pH inicial de los experimentos difiere ligeramente y podría influir en los resultados. Debido a la importancia en el proceso, la influencia de esta variable se estudiará con más detalle en el siguiente Capítulo, relativo a las condiciones de operación.

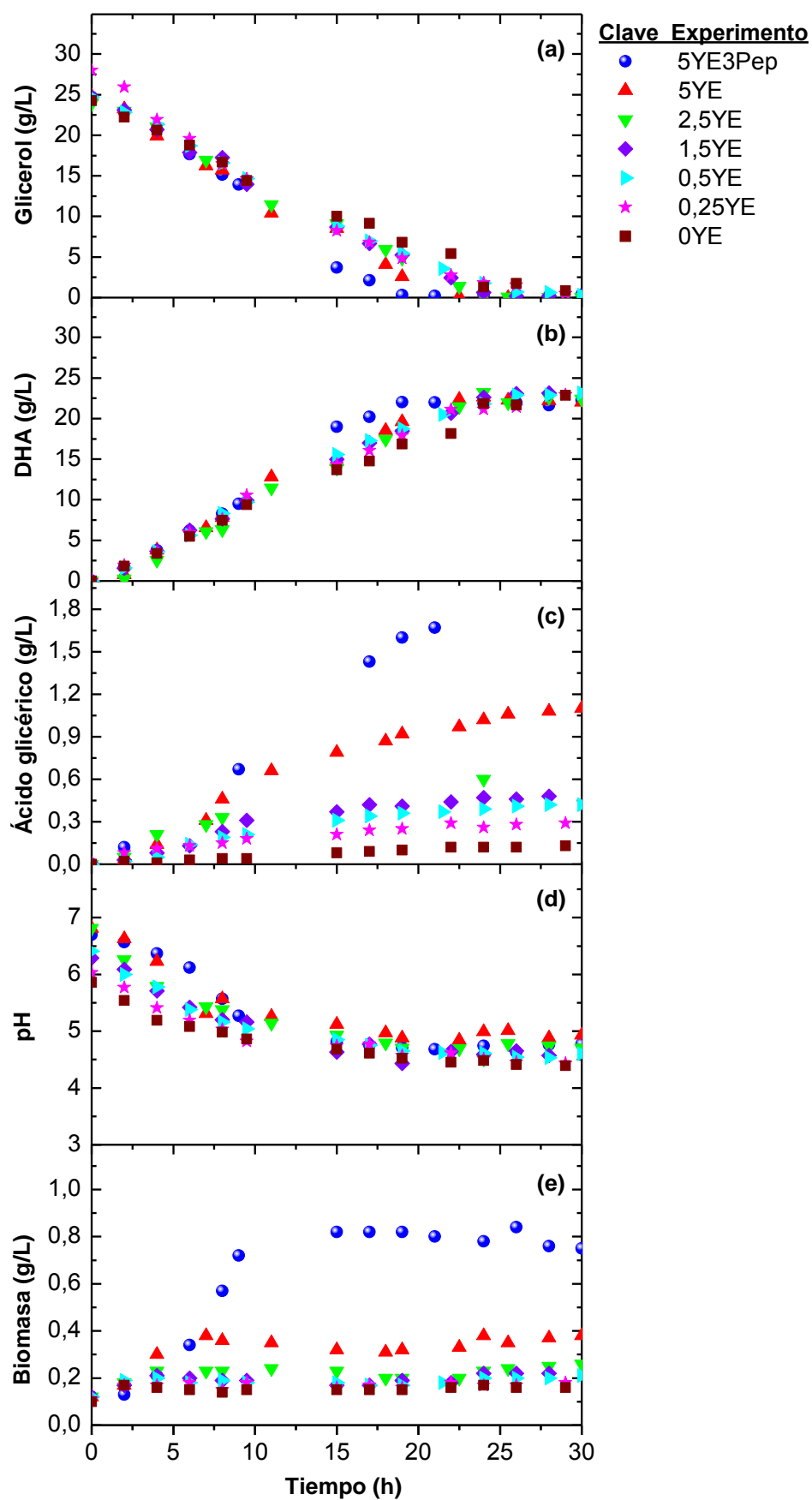


Figura 3.1. Evolución de la concentración de glicerol (a); la DHA (b); el ácido glicérico (c); el pH (d) y la biomasa (e) para los experimentos 5YE3Pep, 5YE, 2,5YE, 1,5YE, 0,5YE, 0,25YE y 0YE.

Otro aspecto relevante mostrado en la Figura 3.1 es la producción de biomasa; como es lógico, la concentración máxima de biomasa alcanzada aumenta con la cantidad de fuente compleja aportada al medio. No obstante, en proporción, la peptona tiene una mayor influencia en el crecimiento que el extracto de levadura, por lo que resulta interesante su uso en el medio de cultivo de las etapas previas de preinóculo e inóculo. Sin embargo, llama la atención que, aunque en el experimento *5YE3Pep* hay casi 5 veces más biomasa que en el experimento *0YE*, el proceso de producción de DHA no transcurre proporcionalmente más rápido.

Con el objetivo de poder comparar cuantitativamente los resultados de los experimentos, se han calculado los tres parámetros de interés en los bioprocesos que se definen a continuación:

Rendimiento ($Y_{P/S}$)

Este parámetro relaciona la concentración final de producto obtenido y la concentración inicial de sustrato empleado, según la ecuación [3.3]. Por lo tanto, indica la cantidad de sustrato que es necesario utilizar para alcanzar una concentración de producto determinada.

$$Y_{P/S}(\%) = \frac{C_{DHA}^{final}}{C_{Glicerol}^0} \cdot 100 \quad [3.3]$$

Productividad volumétrica (P_V)

La productividad volumétrica expresa la cantidad de producto alcanzada por unidad de tiempo y de volumen, de acuerdo con la ecuación [3.4]. En este caso, el parámetro hace énfasis en el tiempo que se necesita para obtener una concentración de producto establecida.

$$P_V \left(\frac{g_{DHA}}{L \cdot h} \right) = \frac{C_{DHA}^{final}}{t} \quad [3.4]$$

Productividad específica (P_s)

Esta productividad refleja la cantidad de producto producida por unidad de biomasa y tiempo, tal y como se observa en la ecuación [3.5]. Así, la productividad específica da

una idea de cómo de activa es la biomasa empleada en el proceso, o lo que es lo mismo, qué cantidad de biomasa es necesaria para llevar a cabo la biotransformación.

$$P_s \left(\frac{g_{DHA}}{g_X \cdot h} \right) = \frac{C_{DHA}^{final}}{C_X^{final} \cdot t} \quad [3.5]$$

En la Figura 3.2 están representados los valores de rendimiento ($Y_{P/S}$), productividad volumétrica (P_V) y productividad específica (P_S) en función de la cantidad de fuente de nitrógeno añadida al medio de producción.

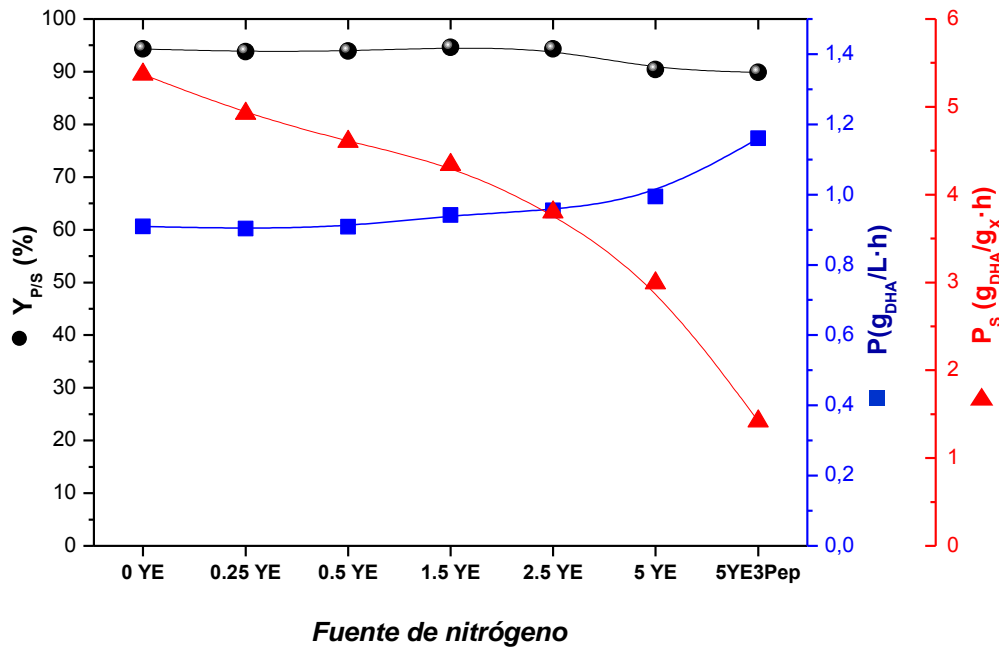


Figura 3.2. Rendimiento a DHA (diagrama de barras), productividad volumétrica (cuadrados azules) y productividad específica (triángulos rojos) en función de la cantidad de fuente de nitrógeno añadida al medio.

En términos de rendimiento, los experimentos que contienen menos de 5 g/L de extracto de levadura presentan unos valores entorno al 95 %; mientras que en los experimentos con mayor cantidad de fuente compleja, el rendimiento baja ligeramente hasta el 90 %. Este comportamiento refleja que al aumentar la cantidad de fuente compleja se deriva mayor cantidad de sustrato hacia la producción de subproducto y biomasa, tal y como se aprecia en las Figuras 3.1 (c) y (e), respectivamente.

Por otro lado, se puede observar un aumento de la productividad al aumentar la cantidad de fuente compleja (y por tanto, de biomasa), aunque no muy acusado. Este aumento resulta casi imperceptible en los experimentos en los que se añaden de 0 a 2,5 g/L de extracto de levadura. Este fenómeno puede deberse a que en dichos experimentos la cantidad de biomasa generada es prácticamente la misma (ver Figura 3.1 (e)).

No obstante, aunque la productividad parece ligada a la cantidad de biomasa generada, esta relación no es directamente proporcional. Las células son mucho menos productivas a medida que se añade más cantidad de fuente compleja al medio, tal y como muestra el parámetro de productividad específica. Sin embargo, todas las células de los diferentes experimentos proceden del mismo inóculo y deberían de ser igual de activas inicialmente. Por lo tanto, hay algún fenómeno que hace que su comportamiento sea diferente.

En bibliografía se ha descrito la formación de membranas intracitoplasmáticas y ribosomas en *G. oxydans* al final de la etapa exponencial en un medio mínimo (Batzing y Claus, 1973). Gracias a estas membranas, las células son capaces de oxidar el glicerol más rápidamente, debido a que en ellas se sintetiza la enzima glicerol deshidrogenasa (White y Claus, 1982). Cabría pensar que quizás la escasez de nutrientes en el medio podría estimular la formación de estas membranas, tal y como ocurre en otros microorganismos procariotas Gram negativos como *Azotobacter vinelandii* (Oppenhei y Marcus, 1970), o *E. coli* (Cota-Robles E., 1966). Sin embargo, esta hipótesis ha sido descartada al confirmarse la formación de membranas intracitoplasmáticas al final de la etapa exponencial también en medios complejos. Por lo tanto, el estrés nutricional provocado por la escasez de nutrientes no es el causante del aumento de actividad (Claus y col., 1975). No obstante, el final de la etapa exponencial y, por tanto, la formación de membranas con alto contenido enzimático, se da a distintos tiempos en los diferentes experimentos. En los medios menos ricos, esta etapa se alcanza muy rápidamente, a las 2-3 horas de reacción. Por lo tanto, las células desarrollan mucho antes las membranas y, quizás, este aumento de actividad a horas tempranas compense la escasez de biomasa. Esto explicaría el hecho de que no haya prácticamente diferencias en la producción de DHA durante las primeras de 10 horas de biotransformación. A partir de este punto, las células de medios más ricos comenzarían a formar las membranas y, por ello, se observa un ligero aumento en la velocidad de

producción de DHA, como puede apreciarse en la Figura 3.1 (b). Sin embargo, comparando las Figuras 3.1 (b) y (e), se observa que la velocidad de producción de DHA sigue sin ser proporcional a la cantidad de biomasa, una vez que las células de todos los experimentos han desarrollado las membranas intracitoplasmáticas. Para tratar de esclarecer este comportamiento, en el apartado 3.2.3 se va a estudiar con más detalle la influencia de la concentración de biomasa en la velocidad de producción mediante la realización de un ensayo de actividad enzimática.

3.2.3 Ensayo de actividad enzimática

Con el objetivo de aislar el efecto del crecimiento y estudiar únicamente la influencia de la concentración de biomasa sobre la velocidad de producción de DHA, se han realizado ensayos con las células en estado de reposo o *resting cells*, es decir, en ausencia de crecimiento. De este modo, puede evaluarse la actividad de la enzima glicerol deshidrogenasa (Nabe y col., 1979). Dicha actividad enzimática se expresa como la velocidad de producción de DHA a tiempo cero (a_0), obtenida a partir de la pendiente de la recta C_{DHA} vs t de los experimentos en *resting cells*.

Los ensayos de actividad enzimática se han realizado siguiendo la metodología experimental descrita previamente en el Apartado 2.3.5 del Capítulo 2. Las condiciones experimentales son idénticas a las que se usaron para realizar el estudio del medio de cultivo con el fin de obtener resultados comparables. Se han realizado experimentos para un intervalo de concentraciones de biomasa (C_X) comprendido entre 0,01 y 1 g/L, tomando muestras de los experimentos durante cuatro horas.

Además, se ha calculado la velocidad inicial de producción de DHA (R_{DHA}^0) en los experimentos del estudio del medio a partir de la pendiente en el tramo lineal de la curva de producción de DHA. Todo ello con la finalidad de poder comparar estos valores de velocidad inicial de producción (R_{DHA}^0) con la actividad enzimática obtenida en el ensayo (a_0) y comprobar si los datos del ensayo de actividad enzimática explican los resultados experimentales obtenidos. Para poder realizar esta comparación se ha tomado como valor de referencia la concentración final de biomasa alcanzada en los experimentos llevados a cabo con la adición de distintas cantidades de fuente compleja.

En la Figura 3.3 se muestran los datos de actividad enzimática en forma de concentración de DHA frente al tiempo y el ajuste lineal realizado para cada uno de los ensayos. Los valores de actividad enzimática (a_0) y el coeficiente de correlación obtenido en cada caso (r^2) se exponen en la Tabla 3.10. Asimismo, los ajustes lineales realizados para los datos experimentales del estudio del medio están representados en la Figura 3.4, mientras que los valores de velocidad inicial de producción de DHA (R_{DHA}^0), así como la concentración de biomasa final (C_X final) y la bondad del ajuste (r^2) se muestran en la Tabla 3.11.

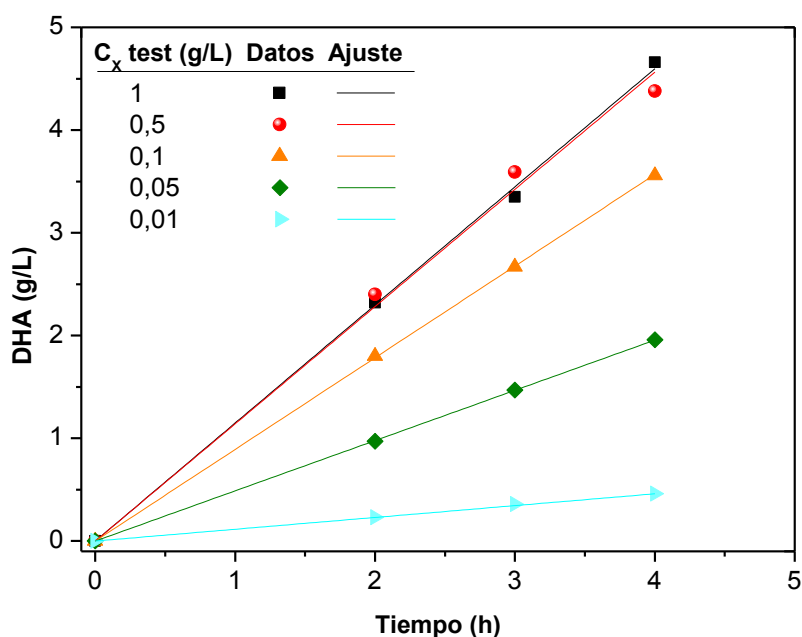


Figura 3.3. Representación de los ajustes lineales realizados a los datos obtenidos en el ensayo de actividad enzimática para distintas concentraciones de biomasa.

Tabla 3.10. Valores de actividad enzimática (a_0) para las distintas concentraciones de biomasa ensayadas.

C_X (g/L)	a_0 ($g_{DHA}/L \cdot h$)	r^2
1	1,13	0,999
0,5	1,14	0,994
0,1	0,89	0,999
0,05	0,49	0,999
0,01	0,12	0,999

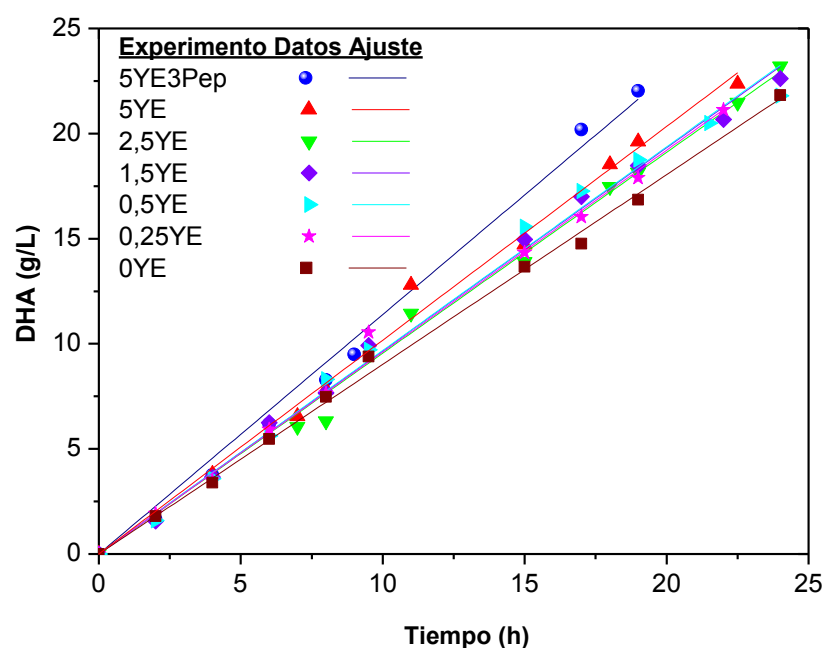


Figura 3.4. Representación de los ajustes lineales de los datos de concentración de DHA frente al tiempo de los distintos experimentos mostrados en el apartado 3.2.1 para el cálculo de R_{DHA}^0 .

Tabla 3.11. Valores de velocidad de producción de DHA (R_{DHA}^0) y C_X máxima de los experimentos con distinta concentración de fuente compleja.

Experimento	C_X final (g/L)	R_{DHA}^0 (g/L·h)	r^2
5YE3pep	0,82	1,14	0,996
5YE	0,38	1,02	0,998
2,5YE	0,28	0,96	0,998
1,5YE	0,23	0,97	0,999
0,5YE	0,22	0,97	0,997
0,25YE	0,18	0,96	0,998
0YE	0,17	0,90	0,999

Una vez obtenidos los datos de actividad enzimática, mostrados en la Tabla 3.10, éstos se han representado frente a la concentración de biomasa para determinar la relación existente entre ambas magnitudes. En la Figura 3.5 se observan claramente dos regiones: en la primera de ellas, para $C_X \leq 0,2$ g/L (aproximadamente), existe una relación directamente proporcional entre la concentración de biomasa y la actividad enzimática; es decir, al aumentar la biomasa, aumenta proporcionalmente la actividad

enzimática, como cabría esperar; sin embargo, en la segunda región, correspondiente a $C_X > 0,2$ g/L, la actividad enzimática aumenta ligeramente y, a continuación, permanece prácticamente constante.

En los experimentos realizados para el estudio del medio se ha trabajado con una concentración de biomasa superior a 0,17 g/L (valor obtenido en el experimento con menor cantidad de extracto de levadura; *OYE*), muy cerca del valor límite a partir del cual no se aprecia un aumento muy significativo de la actividad enzimática. Por lo tanto, el ensayo propuesto es válido para explicar los resultados experimentales mostrados en la Figura 3.1. De hecho, representando los valores de R_{DHA}^0 de estos experimentos y a_0 en función de la concentración de biomasa final, tomada como valor de referencia, se obtiene una tendencia idéntica (ver Figura 3.6), lo que pone de manifiesto que la actividad enzimática obtenida según el ensayo estándar, a_0 , y la velocidad inicial de producción de DHA, R_{DHA}^0 , son coincidentes. Por lo tanto, en los siguientes Capítulos se va a calcular la actividad enzimática directamente a partir de los datos de los experimentos, como la pendiente de la recta de producción de DHA con el tiempo y se usarán ambos términos (a_0 y R_{DHA}^0) indistintamente.

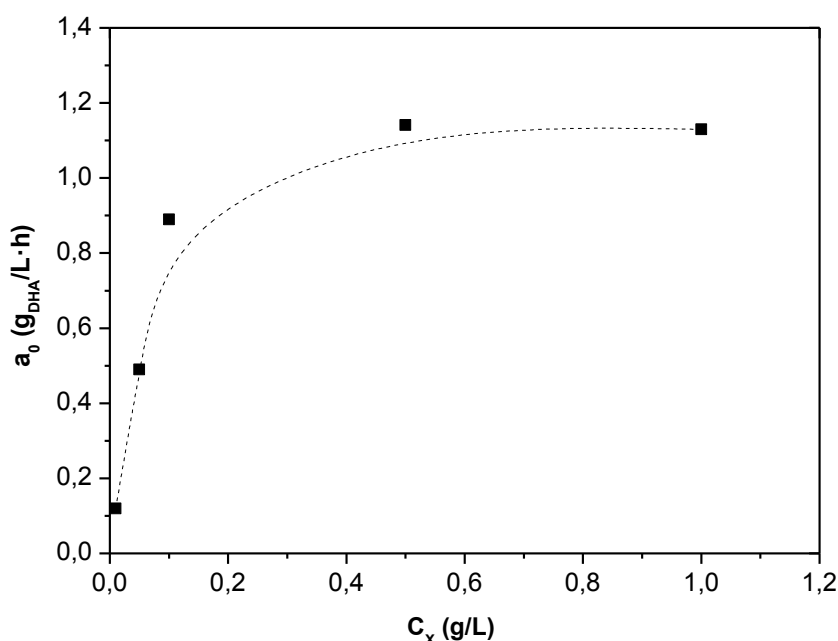


Figura 3.5. Efecto de la concentración de biomasa (C_X) sobre la actividad enzimática de *G. oxydans* (a_0) a 30 °C y 200 rpm en matraz Erlenmeyer.

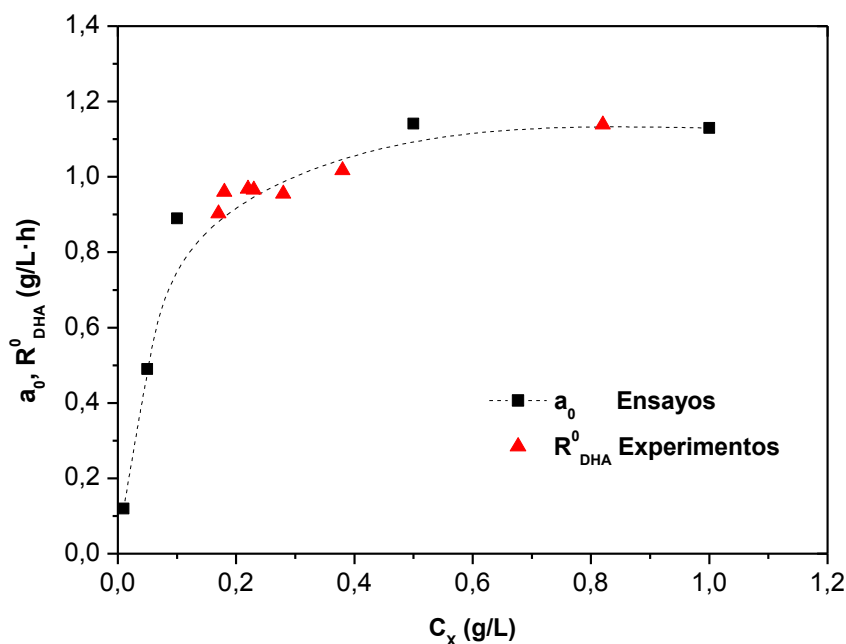


Figura 3.6. Comparación entre la velocidad de producción de DHA en los experimentos del estudio del medio (R_{DHA}^0) y la actividad enzimática obtenida en los ensayos (a_0).

No obstante, las causas de la tendencia observada no están claras. En bibliografía únicamente se ha encontrado una publicación en la que se estudia expresamente la influencia de la concentración de biomasa en el proceso de producción de DHA con células en estado de *resting cells* (Hu y col., 2011), aunque no analizan la actividad enzimática. Las conclusiones a las que llegan son consistentes con los resultados del presente estudio: estos autores sólo consiguen un ligero aumento de la producción de DHA al aumentar considerablemente la cantidad de biomasa (desde 4 hasta 12 g/L). Además, observan un aumento del consumo de base (NaOH) necesario para mantener constante el pH a medida que aumenta la concentración de biomasa. De este modo, formulan la hipótesis de que al aumentar la concentración de biomasa se produce mucha más cantidad de subproducto en detrimento de la producción de DHA. Aunque esta afirmación se ha corroborado en el presente trabajo (ver Figura 3.1 (c)), sin embargo, los niveles de ácido glicérico producido son demasiado bajos como para limitar tanto la producción de DHA. Más bien parece como si hubiera algún otro factor limitante, aún sin identificar, cuando se trabaja con $C_X > 0,2$ g/L, pero este problema se abordará más adelante tratando de identificar las causas a través del estudio de las condiciones de operación en el Capítulo 4.

En cualquier caso, de cara a los estudios posteriores se va a utilizar como medio de producción aquél que no contiene fuente compleja (el medio correspondiente al experimento *OYE*, descrito en la Tabla 3.2), ya que la actividad enzimática de los medios más complejos no es mucho mayor y ya se han comentado previamente las ventajas de emplear un medio lo más simple posible.

3.3 ESTUDIO DE LA INHIBICIÓN POR SUSTRATO

La concentración inicial de glicerol parece afectar al crecimiento de *G. oxydans*. Sin embargo, no está claro en la bibliografía consultada que también afecte de manera negativa a la producción de DHA. Por lo tanto, en este apartado se va a estudiar la influencia del glicerol en la producción de DHA con el objetivo de tratar de esclarecer este punto.

Para abordar este estudio se han realizado experimentos con concentraciones crecientes de glicerol en matraz *Erlenmeyer* a 30 °C y 200 rpm, con el medio seleccionado en el apartado anterior (sin adición de extracto de levadura ni peptona). El intervalo de concentraciones estudiadas comprende desde 25 hasta 134 g/L de glicerol, tal y como se observa en la tabla de planificación experimental (Tabla 3.12).

Tabla 3.12. *Planificación experimental para el estudio de inhibición por sustrato.*

Experimento	Glicerol inicial (g/L)
Glic-25	25
Glic-40	40
Glic-50	50
Glic-55	55
Glic-74	74
Glic-92	92
Glic-134	134

3.3.1 Resultados experimentales

En este apartado se presentan los resultados obtenidos en los experimentos con distintas concentraciones iniciales de glicerol. En las Tablas 3.13 a 3.19, se recoge la evolución de las concentraciones de los principales compuestos involucrados en el bioproceso (glicerol, DHA y ácido glicérico), así como el pH y la concentración de biomasa, para

los distintos experimentos planteados en la Tabla 3.12. La producción de DHA y ácido glicérico en términos de concentración se ha calculado a través de las ecuaciones [3.1] y [3.2], respectivamente.

Tabla 3.13. Resultados del experimento Glic-25 (25 g/L de glicerol).
Condiciones: 30 °C, 200 rpm, pH libre, 20 % v/v inóculo.

Tiempo [h]	Biomasa [g/L]	pH	Glicerol [g/L]	DHA producida [g/L]	Ácido glicérico producido [g/L]
0	0,10	5,86	24,26	0,00	0,00
2	0,17	5,54	22,24	1,80	0,03
4	0,16	5,19	20,64	3,40	0,04
6	0,15	5,08	18,77	5,47	0,05
8	0,14	4,98	17,09	7,47	0,07
9,5	0,15	4,86	14,40	9,39	0,07
15	0,15	4,68	10,03	13,67	0,13
17	0,15	4,61	9,16	14,76	0,14
19	0,15	4,52	6,81	16,85	0,16
22	0,16	4,45	5,42	18,14	0,19
24	0,17	4,48	1,29	21,83	0,19
26	0,16	4,41	1,76	21,69	0,20
29	0,16	4,35	0,84	22,87	0,21

Tabla 3.14. Resultados del experimento Glic-40 (40 g/L de glicerol).
Condiciones: 30 °C, 200 rpm, pH libre, 20 % v/v inóculo.

Tiempo [h]	Biomasa [g/L]	pH	Glicerol [g/L]	DHA producida [g/L]	Ácido glicérico producido [g/L]
0	0,11	5,94	38,52	0,00	0,00
2	0,18	5,47	30,87	1,38	0,13
4	0,16	5,17	27,94	3,35	0,14
6	0,15	5,01	25,13	6,17	0,23
8	0,15	4,78	24,04	8,00	0,25
9,5	0,16	4,79	21,13	9,04	0,29
24,5	0,16	4,33	7,62	22,21	0,42
28	0,16	4,28	5,76	23,41	0,47
30	0,17	4,24	4,33	24,72	0,51
32,5	0,17	4,24	3,11	25,40	0,51
49	0,18	4,08	0,19	29,12	0,61
52	0,18	4,09	0,03	28,98	0,61
74	0,21	4,1	0,03	28,98	0,69

Tabla 3.15. Resultados del experimento Glic-50 (50 g/L de glicerol).
Condiciones: 30 °C, 200 rpm, pH libre, 20 % v/v inóculo.

Tiempo [h]	Biomasa [g/L]	pH	Glicerol [g/L]	DHA producida [g/L]	Ácido glicérico producido [g/L]
0	0,11	5,88	48,02	0,00	0,00
2	0,16	5,44	40,56	1,49	0,00
4	0,16	5,1	37,75	3,56	0,00
6	0,15	4,9	35,81	5,61	0,00
8	0,16	4,8	33,52	7,71	0,02
9,5	0,16	4,7	31,62	9,47	0,03
24,5	0,16	4,16	18,26	22,38	0,31
26	0,16	4,12	17,17	22,91	0,36
28	0,16	4,03	16,16	24,24	0,38
30	0,16	4,04	14,26	26,12	0,40
32,5	0,17	3,98	11,98	28,05	0,45
49	0,18	3,83	6,28	34,55	0,61
52	0,19	3,79	5,84	35,24	0,66
74	0,20	3,73	2,23	38,26	0,76

Tabla 3.16. Resultados del experimento Glic-55 (55 g/L de glicerol).
Condiciones: 30 °C, 200 rpm, pH libre, 20 % v/v inóculo.

Tiempo [h]	Biomasa [g/L]	pH	Glicerol [g/L]	DHA producida [g/L]	Ácido glicérico producido [g/L]
0	0,11	5,91	55,58	0,00	0,00
2	0,17	5,46	50,32	1,55	0,00
4	0,16	5,09	47,81	3,70	0,00
6	0,16	4,83	46,30	5,50	0,03
8	0,16	4,67	43,55	8,31	0,05
9,5	0,16	4,61	42,24	9,90	0,21
24,5	0,17	3,95	28,97	22,11	0,58
26	0,17	3,95	27,17	23,84	0,61
28	0,17	3,92	25,48	25,84	0,64
30	0,18	3,92	23,21	27,60	0,68
32,5	0,18	3,84	23,16	28,26	0,73
49	0,20	3,69	16,27	35,99	0,96
52	0,19	3,65	15,03	37,69	0,96
74	0,21	3,58	11,54	41,05	1,11

Tabla 3.17. Resultados del experimento Glic-74 (74 g/L de glicerol).
Condiciones: 30 °C, 200 rpm, pH libre, 20 % v/v inóculo.

Tiempo [h]	Biomasa [g/L]	pH	Glicerol [g/L]	DHA producida [g/L]	Ácido glicérico producido [g/L]
0	0,11	6,23	73,50	0,00	0,00
3	0,19	5,6	61,73	2,89	0,13
7	0,19	4,91	57,11	6,20	0,25
24	0,23	3,93	40,21	21,56	0,76
27	0,22	3,79	38,47	22,87	0,86
31	0,24	3,76	35,73	26,01	0,95
34	0,24	3,74	33,32	28,58	1,09
48	0,26	3,68	25,20	35,81	1,21
51	0,27	3,62	25,03	36,71	1,32
55	0,28	3,52	24,07	37,43	1,41
72	0,28	3,58	20,93	40,54	1,75
98	0,29	3,42	20,08	41,30	1,93
147	0,30	3,46	19,52	42,71	2,06

Tabla 3.18. Resultados del experimento Glic-92 (92 g/L de glicerol).
Condiciones: 30 °C, 200 rpm, pH libre, 20 % v/v inóculo.

Tiempo [h]	Biomasa [g/L]	pH	Glicerol [g/L]	DHA producida [g/L]	Ácido glicérico producido [g/L]
0	0,10	5,93	92,09	0,00	0,00
4,5	0,16	4,83	85,23	3,95	0,00
8	0,17	4,43	81,31	7,93	0,12
10	0,17	4,29	79,00	9,67	0,17
24	0,19	3,66	66,72	21,81	0,92
28	0,19	3,57	65,23	23,18	1,11
35	0,20	3,45	63,07	25,21	1,24
47	0,20	3,34	60,03	28,13	1,57
52	0,21	3,37	58,34	30,17	1,65
56	0,19	3,32	58,94	29,86	1,76
80	0,20	3,27	57,81	31,72	1,86
97	0,22	3,35	56,52	33,66	2,03
123	0,21	3,32	57,41	32,96	2,35
147	0,21	3,26	55,98	34,66	2,60

Tabla 3.19. Resultados del experimento Glic-134 (134 g/L de glicerol).
Condiciones: 30 °C, 200 rpm, pH libre, 20 % v/v inóculo.

Tiempo [h]	Biomasa [g/L]	pH	Glicerol [g/L]	DHA producida [g/L]	Ácido glicérico producido [g/L]
0	0,09	5,94	133,65	0,00	0,00
4,5	0,17	4,59	129,24	3,86	0,08
8	0,17	4,14	125,20	6,96	0,24
10	0,18	4,03	124,11	8,73	0,36
24	0,19	3,45	114,28	18,16	1,30
28	0,19	3,36	113,06	18,82	1,62
35	0,19	3,25	111,34	20,20	1,98
47	0,19	3,17	109,63	21,60	2,39
52	0,20	3,16	109,29	21,84	2,44
56	0,20	3,14	110,03	20,69	2,49
72	0,21	3,20	107,93	23,16	2,53
80	0,21	3,12	106,75	24,33	2,58
97	0,21	3,14	106,39	24,59	2,62
123	0,20	3,14	106,50	23,46	2,69
147	0,20	3,17	105,81	24,97	2,72

3.3.2 Discusión de los resultados

En la Figura 3.7 se da una visión global de los resultados obtenidos en este estudio. Analizando la evolución del glicerol en la Figura 3.7 (a), llama la atención que a medida que aumenta la concentración inicial de glicerol, también aumenta el glicerol residual que permanece sin ser consumido, a pesar de que se prolongue el tiempo de reacción; es decir, el proceso se acaba deteniendo. Este hecho también se evidencia en la producción de DHA y de ácido glicérico (ver Figura 3.7 (b) y (c)). Sin embargo, durante las primeras 24 horas todas las curvas de producción de DHA aparecen solapadas, indicando que la velocidad de producción es idéntica en este tramo e independiente de la concentración inicial de glicerol.

Otro aspecto relevante es la producción de ácido glicérico. En la Figura 3.7 (c) se observa que la producción de este ácido aumenta con la concentración inicial de glicerol, tal y como apuntaron Sato y col. (2013). Por ello, la caída del pH es más acusada en los experimentos con mayor concentración de glicerol, llegándose a alcanzar valores cercanos a 3 (Figura 3.7 (d)). Es posible que esta caída tan acusada del pH esté relacionada con la parada del proceso, ya que, según Svitel y Sturdik (1994), valores

muy ácidos de pH pueden afectar negativamente tanto a la actividad de la enzima glicerol deshidrogenasa como al funcionamiento de la cadena respiratoria del microorganismo.

En términos de producción de biomasa no se observan grandes diferencias a pesar de que en bibliografía se afirma que el glicerol en altas concentraciones interfiere en el crecimiento (Bories y col., 1991; Claret y col., 1992; Ohrem y Voss, 1996). En el presente trabajo, las células se encuentran en un estado de *pseudo-resting cells* ya que no se añaden más nutrientes al medio que aquéllos procedentes del inóculo y el crecimiento está muy limitado. Este efecto puede estar enmascarando la inhibición del crecimiento por altas concentraciones de glicerol.

Atendiendo a la producción de DHA, se observan tres regiones diferenciadas, tal y como se muestra en la Figura 3.8. En la primera de ellas, a tiempos bajos, se aprecia una producción lineal con el tiempo; en la segunda región, la pendiente de la curva de producción de DHA disminuye progresivamente; es decir, se observa una ralentización del proceso; y, finalmente, se distingue una tercera región, en la cual, la concentración de DHA permanece prácticamente invariante con el tiempo a pesar de que siga quedando glicerol residual en algunos experimentos.

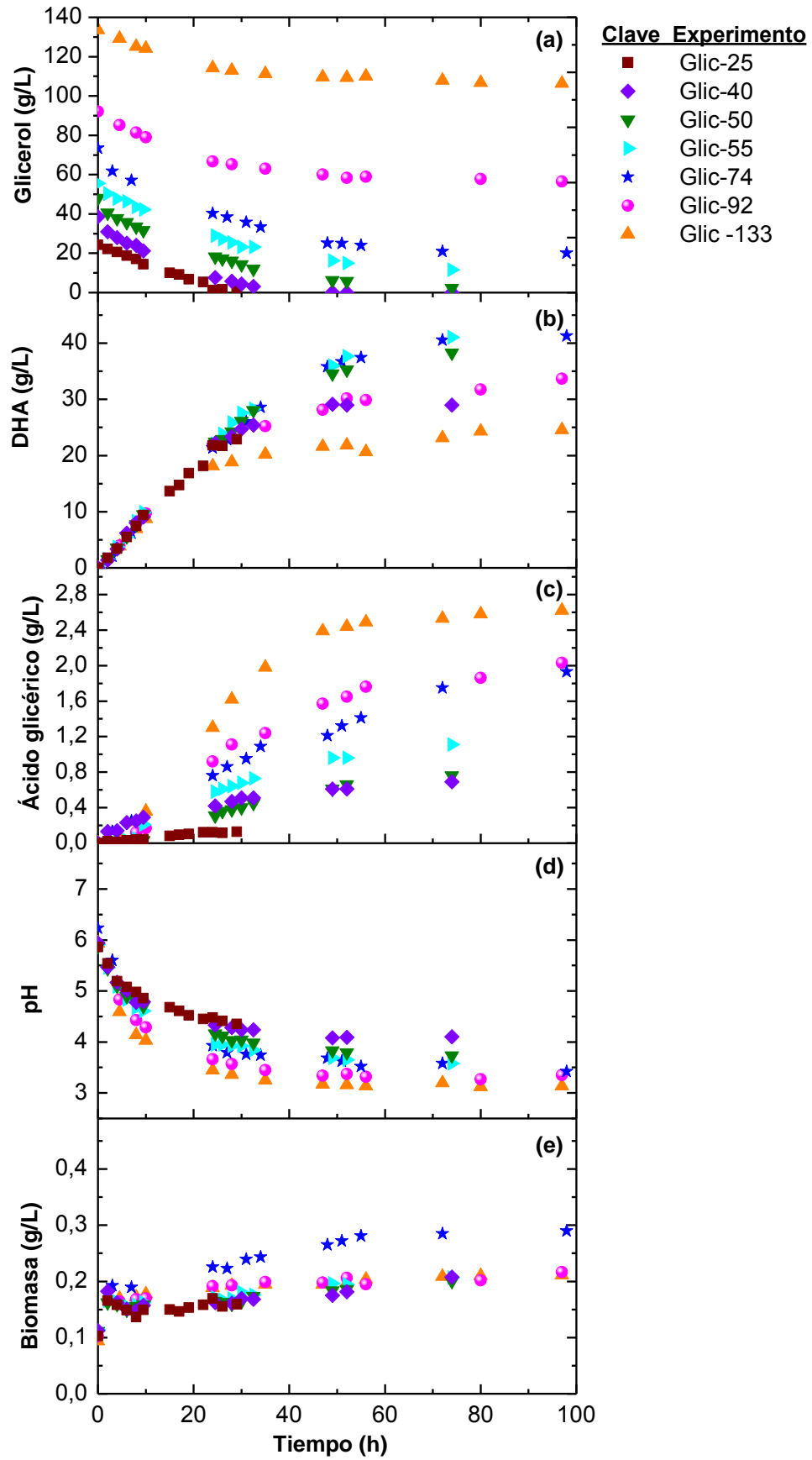


Figura 3.7. Evolución con el tiempo del glicerol (a); la DHA (b); el ácido glicérico (c); el pH (d) y la biomasa (e) para los experimentos Glic-25, Glic-40, Glic-50, Glic-55, Glic-74, Glic-92 y Glic-134.

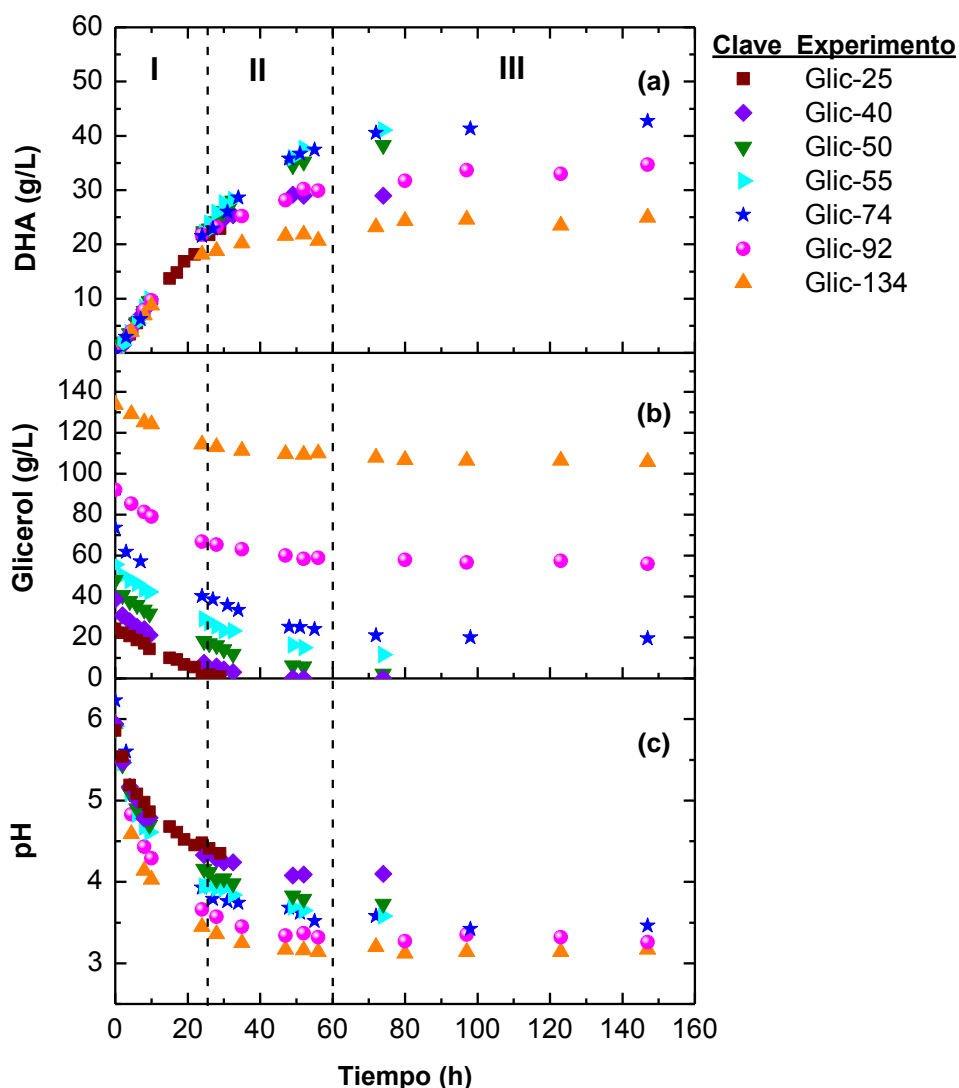


Figura 3.8. Evolución con el tiempo de la DHA (a); el glicerol (b) y el pH (c) para los experimentos Glic-25, Glic-40, Glic-50, Glic-55, Glic-74, Glic-92 y Glic-134. Las líneas discontinuas separan las tres regiones en las que se ha dividido la producción de DHA (región I, II y III).

Las tres regiones descritas anteriormente, mostradas en la figura anterior, van a ser analizadas a continuación más detalladamente.

Región I

Esta región se caracteriza por una velocidad de producción de DHA constante e idéntica en todos los casos, lo que significa que la concentración inicial de glicerol no influye en la actividad. Por otro lado, la concentración de glicerol obedece a una variación lineal, cuya pendiente es prácticamente paralela en todos los experimentos. Además, el pH en ningún caso baja de 4, aunque la acidificación del medio es más acusada cuanto mayor es la concentración inicial de glicerol debido a la mayor producción de ácido glicérico.

Para poder ofrecer datos cuantitativos y evaluar el efecto de la concentración de glicerol sobre la producción de DHA, se ha calculado la velocidad inicial de producción de DHA (actividad enzimática) en este tramo mediante regresión lineal. Los ajustes se muestran gráficamente en la Figura 3.9 y las velocidades iniciales de producción de DHA obtenidas a partir de la pendiente se presentan en la Tabla 3.20 (R^0_{DHA}). En todos los casos, el coeficiente de correlación es mayor de 0,99. Para visualizar mejor la influencia de la concentración de glicerol sobre la velocidad de producción de DHA, se han representado los valores obtenidos en forma de gráfico de barras en la Figura 3.10.

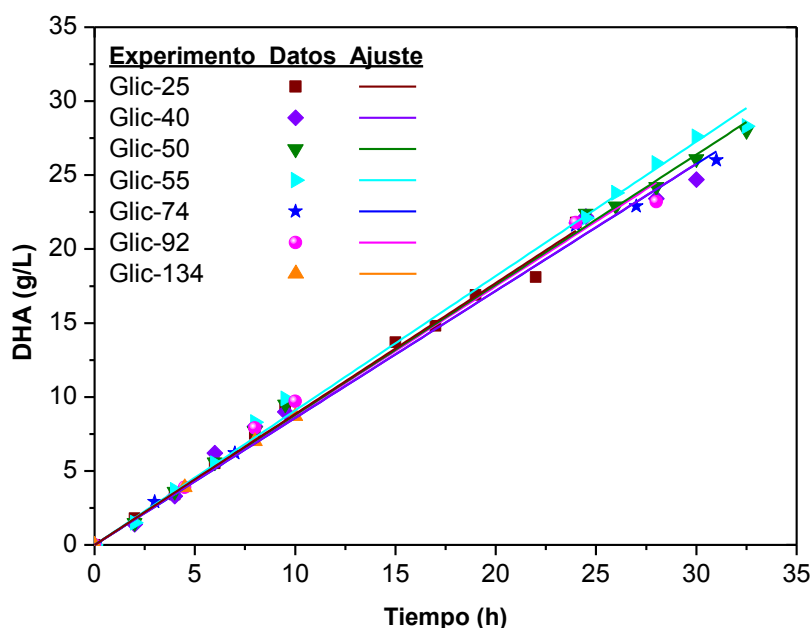


Figura 3.9. Ajustes lineales de los datos de producción de DHA de la región I frente al tiempo para los experimentos Glic-40, Glic-50, Glic-55, Glic-74, Glic-92 y Glic-134.

Tabla 3.20. Velocidad inicial de producción de DHA (R^0_{DHA}) de los experimentos con distinta concentración de glicerol en la región I.

Experimento	R^0_{DHA} (g/L·h)	r^2
Glic-25	0,89	0,993
Glic-40	0,86	0,992
Glic-50	0,88	0,997
Glic-55	0,91	0,996
Glic-74	0,86	0,998
Glic-92	0,87	0,991
Glic-134	0,87	0,999

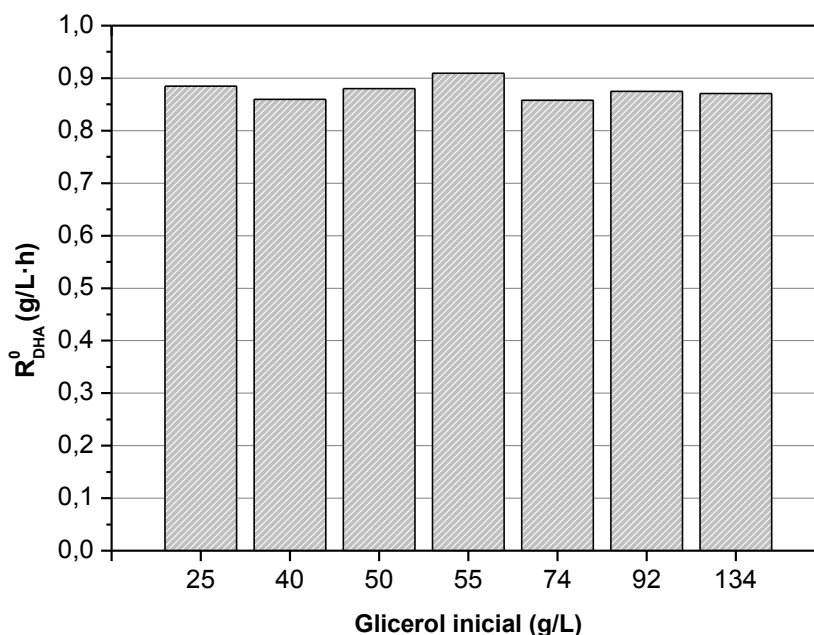


Figura 3.10. Efecto de la concentración inicial de glicerol sobre la velocidad inicial de producción de DHA en la región I (R_{DHA}^0).

Atendiendo a estos resultados, se observa que la velocidad inicial de producción de DHA o actividad enzimática es muy similar en todos los casos, adoptando valores entre 0,86 y 0,91 g/L·h (ver Tabla 3.20). De hecho, en la Figura 3.10 no se aprecia ninguna tendencia en la variación de la velocidad de producción de DHA con la concentración de glicerol y las pequeñas diferencias existentes entre los distintos experimentos podrían achacarse a error experimental. De acuerdo con Ohrem y Merck (1996), el glicerol no inhibe la producción de DHA y así parece constatarse en este estudio. Por lo tanto, se puede afirmar que el glicerol no influye en la velocidad de producción de DHA en el intervalo de concentraciones estudiado, a diferencia de lo que se ha publicado en otros estudios (Bories y col., 1991; Claret y col., 1992; Liebminger y col., 2014). En términos cinéticos, la velocidad de formación de DHA en esta región se puede expresar mediante una reacción de orden cero respecto del sustrato. Esta información es de utilidad para la obtención del modelo cinético en el Capítulo 6.

Región II

La región II se produce a partir de la hora 25 y se extiende hasta la hora 60 aproximadamente, según se muestra en la Figura 3.8. En esta región, la producción de DHA no es lineal con el tiempo y el proceso transcurre más lento que en la región I. En cuanto al pH, éste adopta valores por debajo de 4 en los experimentos en los que sigue quedando glicerol remanente. Esta ralentización del proceso podría estar relacionada con la acidificación del medio o con algún otro fenómeno inhibitorio que se manifiesta en esta región. Cabe destacar que en el experimento *Glic-25* no se observa esta ralentización de la velocidad de producción de DHA porque el glicerol se agota en la región I.

Región III

En la región III no se observa ningún cambio en el proceso a pesar de que hay glicerol remanente en los experimentos *Glic-134*, *Glic-92* y *Glic-74*. Por lo tanto, el proceso está completamente inhibido. El pH final es realmente bajo en los tres experimentos mencionados (alrededor de 3,5). Olijve y Kok (1979) demostraron que valores de pH por debajo de 3,5-4 inhiben completamente la ruta de las pentosas fosfato. Svitel y Sturdik (1994) comprobaron que esos niveles de pH afectan drásticamente a la cadena respiratoria. Por ello, se baraja la hipótesis de que en este caso también sea la acidificación del medio la responsable de la inhibición total del proceso.

Con el objetivo de evaluar la influencia del pH sobre la conversión de glicerol, que da una idea del porcentaje de glicerol consumido respecto del inicial, se ha elaborado la Figura 3.11. En ella, se ha representado la conversión máxima de glicerol alcanzada en cada experimento (X_{Glic}^{max}), calculada mediante la ecuación [3.6], frente al pH final del caldo de reacción. Además, en la Figura 3.12 se puede apreciar la relación entre el rendimiento de los experimentos ($Y_{P/S}$), calculado mediante la ecuación [3.3], y el pH final.

$$X_{Glic}^{max} = \frac{C_{Glic}^0 - C_{Glic}^{final}}{C_{Glic}^0} \cdot 100 \quad [3.6]$$

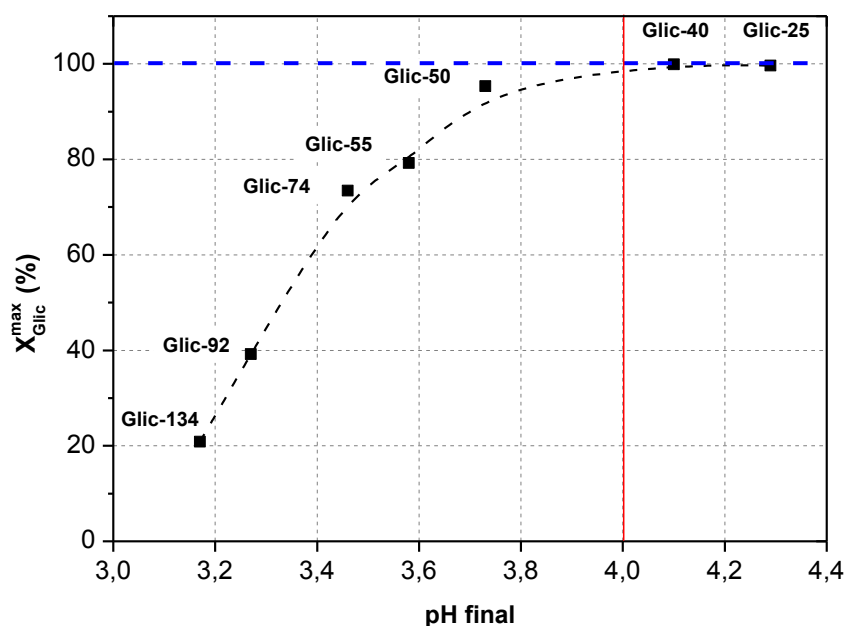


Figura 3.11. Representación gráfica de la relación entre el pH final del caldo y la conversión máxima de glicerol alcanzada (X_{Glic}^{max}) en los experimentos Glic-25, Glic-40, Glic-50, Glic-55, Glic-74, Glic-92 y Glic-134.

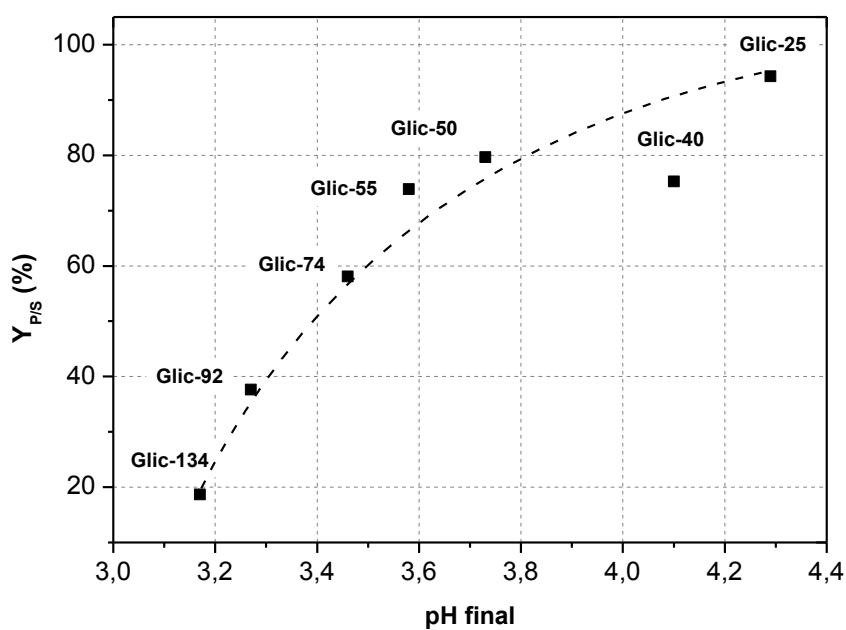


Figura 3.12. Representación gráfica de la relación entre el pH final del caldo y el rendimiento obtenido ($Y_{P/S}$) en los experimentos Glic-25, Glic-40, Glic-50, Glic-55, Glic-74, Glic-92 y Glic-134.

Así, en la Figura 3.11 se observa la existencia de una relación clara entre el pH final y la conversión máxima. A medida que disminuye el pH final, también lo hace la conversión de glicerol. En los únicos experimentos en los que se consume todo el glicerol y, por ende, la conversión alcanzada es del 100 % (*Glic-40* y *Glic-25*), el pH final está por encima de 4. Por lo tanto, el pH parece ser un factor muy importante en el proceso, debiendo mantenerse por encima del valor crítico, que podría establecerse en algún punto entre 3,73 y 4,1, que son los pH finales de los experimentos *Glic-50* (95 % de conversión) y *Glic-40* (100 % de conversión), respectivamente, para evitar que quede glicerol remanente en el caldo.

Por otro lado, atendiendo a la Figura 3.12, se observa una disminución del rendimiento a medida que disminuye el pH final; si bien, esto es consecuencia de la disminución de la conversión mostrada en la Figura 3.11, ya que ambos parámetros están relacionados. Sin embargo, se pueden comparar los rendimientos de los experimentos *Glic-25* y *Glic-40*, ya que en ambos la conversión es completa. En el experimento con 25 g/L de glicerol inicial, el rendimiento es bastante más alto que en el experimento con 40 g/L. No obstante, el valor de $Y_{P/S}$ representado en la Figura 3.12 para el experimento *Glic-40* parece más bajo de lo esperado, según muestra la tendencia global de la gráfica. En cualquier caso, este resultado es lógico puesto que la producción de ácido glicérico en el experimento *Glic-40* es 3,3 veces mayor que en el experimento *Glic-25* (Figura 3.7 (c)), lo que explicaría que el rendimiento a DHA sea menor.

En vista del análisis anterior acerca de la inhibición total del proceso a causa de la bajada del pH, se ha considerado de interés la realización de un experimento con tampón acetato para evitar el descenso del pH por debajo de 4 (*Glic-80/tamp*) y, de este modo, confirmar que la bacteria es capaz de metabolizar todo el glicerol. Este experimento se ha llevado a cabo en matraz *Erlenmeyer* con el mismo medio que los experimentos anteriores, es decir, sin extracto de levadura, ni peptona, pero con una concentración inicial de glicerol de 80 g/L, en presencia de tampón acetato con una fortaleza de 20 mM, a una temperatura de 30 °C y una agitación de 200 rpm. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3.21.

Tabla 3.21. Resultados del experimento *Glic-80/tamp* (80 g/L de glicerol). Condiciones: 30 °C, 200 rpm, pH tamponado, 20 % v/v inóculo.

Tiempo (h)	Biomasa (g/L)	pH	Glicerol (g/L)	DHA (g/L)	DHA producida (g/L)	Ácido glicérico producido (g/L)
0	0,10	4,81	81,47	1,48	0,00	0,00
4	0,14	4,74	76,72	4,87	3,39	0,08
11	0,16	4,64	70,18	11,79	10,31	0,19
24	0,16	4,46	58,24	23,54	22,06	0,36
28	0,17	4,38	52,16	28,40	26,92	0,47
31	-	-	50,15	31,11	29,63	0,64
50	0,17	4,27	40,59	40,05	38,57	0,72
53	0,17	4,18	39,48	42,39	40,91	1,12
56	-	4,19	37,54	44,15	42,68	1,18
75	0,18	4,18	27,68	52,66	51,18	1,23
82	-	-	29,18	52,56	51,08	1,50
105	0,19	4,23	21,52	59,78	58,30	1,56
150	-	4,19	12,00	64,46	62,98	1,74
200	0,18	4,09	4,00	66,50	65,02	1,84

A lo largo de todo el experimento *Glic-80/tamp*, el pH se mantiene en todo momento por encima de 4 y el glicerol se consume casi por completo ($X_{Glic}^{max} = 95\%$), tal y como muestran los datos de la Tabla 3.21, y es posible que, de haber prolongado el experimento, el glicerol se hubiera consumido totalmente. En la Figura 3.13 se comparan los resultados obtenidos en el experimento tamponado con el experimento *Glic-92* (sin tamponar), y se observa que, mientras que el experimento *Glic-80/tamp* continúa prácticamente hasta agotarse el glicerol, en cambio, el experimento *Glic-92* se acaba deteniendo. Por lo tanto, se confirma la hipótesis de que una bajada del pH por debajo de 4 es la responsable de la inhibición total del proceso. No obstante, aplicando la ecuación [3.3] se obtiene un rendimiento cercano al 80 % para el experimento *Glic-80/tamp*, lejos del 94 % de rendimiento obtenido cuando se emplea una concentración de sustrato mucho más baja: 25 g/L. Comparando la producción de ácido glicérico en ambos experimentos, se observa que en el experimento *Glic-80/tamp* dicha producción es 9 veces superior a la que se obtiene en el experimento *Glic-25* (ver datos en las Tablas 3.21 y 3.13, respectivamente). Al aumentar la concentración inicial de glicerol se produce un aumento en la producción de ácido glicérico, lo que se traduce en una disminución en el rendimiento hacia DHA, tal y como se ha observado con anterioridad.

A tenor de lo expuesto anteriormente, parece más ventajoso operar con concentraciones de glicerol bajas para obtener un rendimiento más alto. En este sentido, para conseguir una concentración elevada de producto, parece recomendable operar en modo *fed-batch* dosificando la cantidad de glicerol que se añade al biorreactor, tal y como se ha propuesto en bibliografía en diversos trabajos (Bories y col., 1991; Claret y col., 1992; Claret y col., 1993; Bauer y col., 2005; Hekmat y col., 2007; Hu y col., 2010b). Sin embargo, cabe resaltar que se ha propuesto esta forma de operar como solución al fenómeno de la inhibición por sustrato. No obstante, en este estudio se ha demostrado que no existe tal fenómeno y que la disminución del rendimiento es consecuencia de una mayor producción de subproducto al aumentar la concentración inicial de glicerol. Los autores anteriores únicamente consideraron datos finales de rendimiento y tiempo y no analizaron detalladamente las distintas etapas en la evolución del proceso. Además, tampoco tuvieron en cuenta la producción de subproducto, lo que pudo conducirles a error en la formulación de sus conclusiones.

Por otro lado, volviendo a la Figura 3.13, no existen grandes diferencias en términos de producción de biomasa entre los dos experimentos representados; ni tampoco en términos de producción de ácido glicérico. Sin embargo, lo que es destacable es que en la Figura 3.13 (b) se siguen distinguiendo dos regiones en la producción de DHA: la región I, en la cual la velocidad de producción de DHA es constante, y ambos experimentos presentan la misma actividad independientemente del pH, y la región II, cuya producción es no lineal y más lenta que en la etapa anterior. Dado que el pH está tamponado a lo largo de todo el experimento *Glic-80/tamp*, no parece que éste sea el responsable de la ralentización del proceso, como se había comentado anteriormente en el análisis de la región II. Analizando meticulosamente la gráfica del experimento *Glic-80/tamp*, se observa que la ralentización se produce cuando la producción de DHA alcanza una concentración de 30 g/L. De acuerdo con Stasiak-Rozanska y col. (2014), a partir de este valor comienza a afectarse la actividad metabólica de *G. oxydans*. Por lo tanto, la inhibición por producto podría ser la causa de la ralentización del proceso en la región II. No obstante, en el experimento *Glic-92* esta región comienza un poco antes, coincidiendo con una concentración de DHA de 20 g/L. En este caso pueden estar mezclados ambos efectos: la inhibición por la caída del pH y por el aumento de concentración de producto.

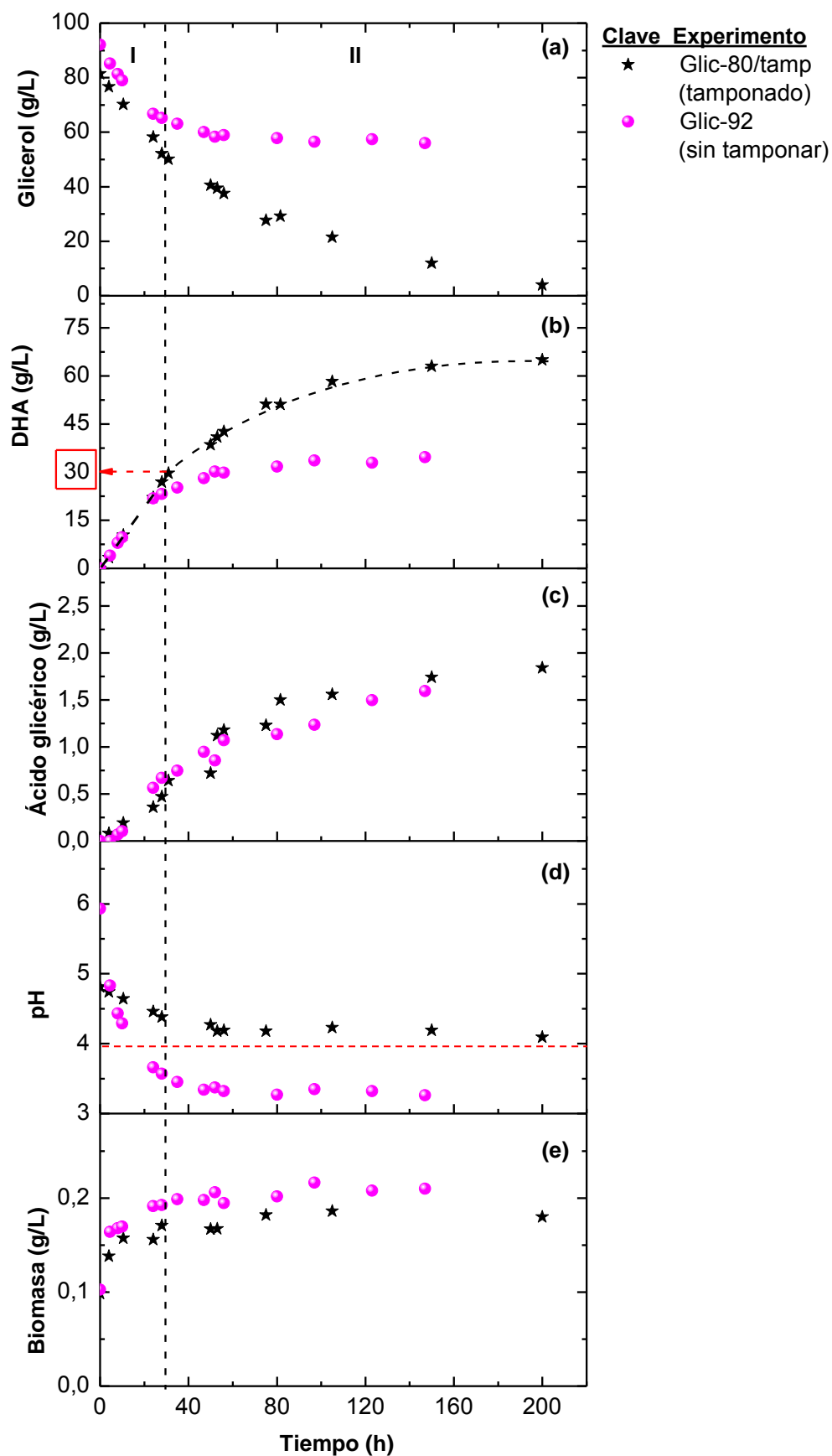


Figura 3.13. Evolución con el tiempo del glicerol (a); la DHA (b); el ácido glicérico (c); el pH (d) y la biomasa (e) para los experimentos Glic-92 (sin tamponar) y Glic-80/tamp (tamponado).

En vista de lo anterior, en el apartado 3.4 se va a estudiar en detalle el fenómeno de inhibición por producto con el objetivo de determinar cuáles son los niveles críticos de la concentración de DHA y en qué medida afectan al proceso de producción.

3.4 ESTUDIO DE LA INHIBICIÓN POR PRODUCTO

En este apartado se va a evaluar el efecto de la concentración de DHA sobre la velocidad de producción. Para ello, se han llevado a cabo tres experimentos con diferentes concentraciones iniciales de DHA y un experimento de control sin adición de producto. Los experimentos se han realizado en matraz *Erlenmeyer* a 200 rpm, 30 °C y con el medio del experimento *OYE*, de manera idéntica que los estudios anteriores. En estos experimentos se ha utilizado una concentración de glicerol de 25 g/L para evitar los efectos inhibitorios que se producen por la bajada del pH al emplear concentraciones más altas de sustrato. La planificación experimental se muestra en la Tabla 3.22.

Tabla 3.22. *Planificación experimental para el estudio de inhibición por producto.*

Experimento	DHA inicial (g/L)
DHA ₀ -0 (<i>control</i>)	0
DHA ₀ -30	30
DHA ₀ -60	60
DHA ₀ -90	90

3.4.1 Resultados experimentales

Los resultados de los experimentos planteados para el estudio de inhibición por producto se presentan en las Tablas 3.23 a 3.26. En estas tablas se muestra la evolución con el tiempo de la concentración de biomasa, de glicerol, de DHA medida en el caldo, así como de DHA y de ácido glicérico, calculadas según las ecuaciones [3.1] y [3.2], respectivamente, además de la evolución del pH.

Tabla 3.23. Resultados del experimento DHA₀₋₀ (0 g/L de DHA inicial). Condiciones: 30 °C, 200 rpm, pH libre, 20 % v/v inóculo.

Tiempo (h)	Biomasa (g/L)	pH	Glicerol (g/L)	DHA (g/L)	DHA producida (g/L)	Ácido glicérico producido (g/L)
0	0,11	5,96	27,34	1,87 ¹	0,00	0,00
2	0,16	5,58	25,05	3,67	1,80	0,02
5	0,15	5,19	20,74	6,40	4,53	0,03
8	0,15	4,98	16,27	9,48	7,61	0,05
10	0,14	4,89	14,64	11,31	9,44	0,06
16	0,15	4,61	8,73	15,63	13,76	0,10
24,5	0,16	4,45	2,88	22,57	20,70	0,16
26	0,16	4,41	1,95	23,89	22,02	0,18
28	0,16	4,40	1,50	23,97	22,10	0,18
30	0,16	4,37	1,11	24,58	22,71	0,19
32	0,16	4,37	0,85	24,64	22,77	0,19
40	0,16	4,37	0,28	25,19	23,32	0,20
51	0,17	4,37	0,32	25,34	23,47	0,21
54	0,17	4,35	0,32	25,40	23,53	0,22

¹ Esta concentración inicial de DHA procede del inóculo.

Tabla 3.24. Resultados del experimento DHA₀₋₃₀ (30 g/L de DHA inicial). Condiciones: 30 °C, 200 rpm, pH libre, 20 % v/v inóculo.

Tiempo (h)	Biomasa (g/L)	pH	Glicerol (g/L)	DHA (g/L)	DHA producida (g/L)	Ácido glicérico producido (g/L)
0	0,11	5,92	30,62	32,63	0,00	0,00
2	0,17	5,30	28,01	33,75	1,12	0,04
4	0,17	4,85	27,51	35,71	3,08	0,06
6	0,17	4,80	24,88	36,23	3,60	0,08
8	0,16	4,64	22,61	37,20	4,57	0,09
10	0,17	4,57	20,80	39,17	6,54	0,11
16	0,17	4,39	15,41	43,35	10,72	0,16
24,5	0,16	4,19	11,45	48,25	15,62	0,22
26	0,17	4,16	9,58	50,13	17,50	0,23
28	0,17	4,14	8,61	51,52	18,89	0,25
30	0,17	4,06	8,44	51,32	18,69	0,26
32	0,17	4,06	6,31	54,43	21,80	0,27
40	0,17	4,03	4,07	56,08	23,45	0,30
49	0,17	4,00	2,29	58,16	25,53	0,33

Tabla 3.25. Resultados del experimento DHA₀₋₆₀ (60 g/L de DHA inicial). Condiciones: 30 °C, 200 rpm, pH libre, 20 % v/v inóculo.

Tiempo (h)	Biomasa (g/L)	pH	Glicerol (g/L)	DHA (g/L)	DHA producida (g/L)	Ácido glicérico producido (g/L)
0	0,11	5,88	29,45	60,79	0,00	0,00
2	0,15	5,24	28,40	61,78	0,99	0,01
4	0,16	4,69	27,35	62,60	1,81	0,04
6	0,16	4,69	26,17	63,62	2,82	0,05
8	0,16	4,56	24,89	65,33	4,54	0,07
10	0,17	4,51	23,45	66,06	5,27	0,09
16	0,16	4,36	20,41	69,27	8,48	0,13
24,5	0,16	4,10	16,14	73,60	12,81	0,20
26	0,17	4,09	14,11	75,75	14,96	0,20
28	0,17	4,06	13,69	75,32	14,53	0,22
30	0,17	4,01	13,83	75,77	14,98	0,25
32	0,17	3,98	13,05	77,72	16,93	0,26
40	0,17	3,96	10,96	79,65	18,86	0,28
49	0,17	3,94	8,45	81,17	20,38	0,31

Tabla 3.26. Resultados del experimento DHA₀₋₉₀ (90 g/L de DHA inicial). Condiciones: 30 °C, 200 rpm, pH libre, 20 % v/v inóculo.

Tiempo [h]	Biomasa [g/L]	pH	Glicerol [g/L]	DHA [g/L]	DHA producida [g/L]	Ácido glicérico producido [g/L]
0	0,10	5,72	29,43	87,99	0,00	0,00
2	0,13	5,17	28,55	89,41	1,42	0,02
4	0,14	4,61	28,04	90,16	2,17	0,05
6	0,14	4,64	27,44	90,29	2,30	0,06
8	0,13	4,58	26,01	91,96	3,97	0,09
10	0,15	4,52	25,09	93,06	5,07	0,10
16	0,14	4,36	22,64	93,91	5,92	0,13
24,5	0,13	4,22	21,19	97,01	9,02	0,17
26	0,15	4,16	20,68	97,46	9,47	0,19
28	0,15	4,15	19,85	98,50	10,51	0,20
30	0,15	4,12	19,59	98,91	10,92	0,21
32	0,15	4,10	19,22	99,53	11,54	0,21
40	0,15	4,01	17,97	100,73	12,74	0,24
49	0,15	4,02	16,16	101,59	13,60	0,26

3.4.2 Discusión de los resultados

En la Figura 3.14 se muestra el efecto de la adición de distintas concentraciones de DHA al comienzo de los experimentos en el consumo de glicerol, la producción de DHA y de ácido glicérico, el pH y la velocidad de crecimiento. Existe una afectación clara y bastante acusada de la velocidad de consumo de glicerol y de la velocidad de producción de DHA al incrementarse la cantidad inicial de DHA añadida al medio, tal y como muestran las Figura 3.14 (a) y (b), respectivamente. Sin embargo, no se observan grandes diferencias en cuanto a la producción de ácido glicérico (Figura 3.14 (c)) y, por tanto, la evolución del pH es muy similar en todos los experimentos (Figura 3.14 (d)). En ningún caso el valor de pH disminuye por debajo de 4, tal y como se pretendía al usar únicamente 25 g/L de glicerol. De este modo, la inhibición de la producción observada se puede relacionar directamente con la concentración de producto.

En términos de crecimiento, la Figura 3.14 (e) muestra un comportamiento muy similar al observado en los estudios anteriores, realizados también sin adición de fuentes complejas y con la misma concentración de sustrato (Figura 3.1 y Figura 3.7 (e)). Por lo tanto, no se aprecia una inhibición del crecimiento al emplear altas concentraciones de DHA, a diferencia de lo que se afirma en la bibliografía. Diversos autores han demostrado que la DHA inhibe el crecimiento celular, debido a que el sistema enzimático responsable del transporte de glicerol al interior de la célula presenta una elevada sensibilidad hacia la molécula de DHA (Claret y col., 1994). Según estos autores, la velocidad de crecimiento de la bacteria va disminuyendo hasta detenerse y coinciden con otros autores en afirmar que la inhibición total del crecimiento se produce cuando la concentración de DHA supera los 60 g/L, aunque no ocurre así con la producción, que continúa a pesar de que el crecimiento se haya detenido, desacoplándose ambos fenómenos. Por lo tanto, la DHA afecta de manera más acusada al crecimiento que a la producción (Bories y col., 1991; Claret y col., 1992; Hekmat y col., 2003). Sin embargo, aunque en este estudio se ha corroborado la inhibición de la producción, como se ha comentado en el párrafo anterior; no se ha observado ningún efecto inhibitorio del crecimiento, probablemente debido a que éste ya está limitado por la escasez de nutrientes del medio empleado para realizar los experimentos.

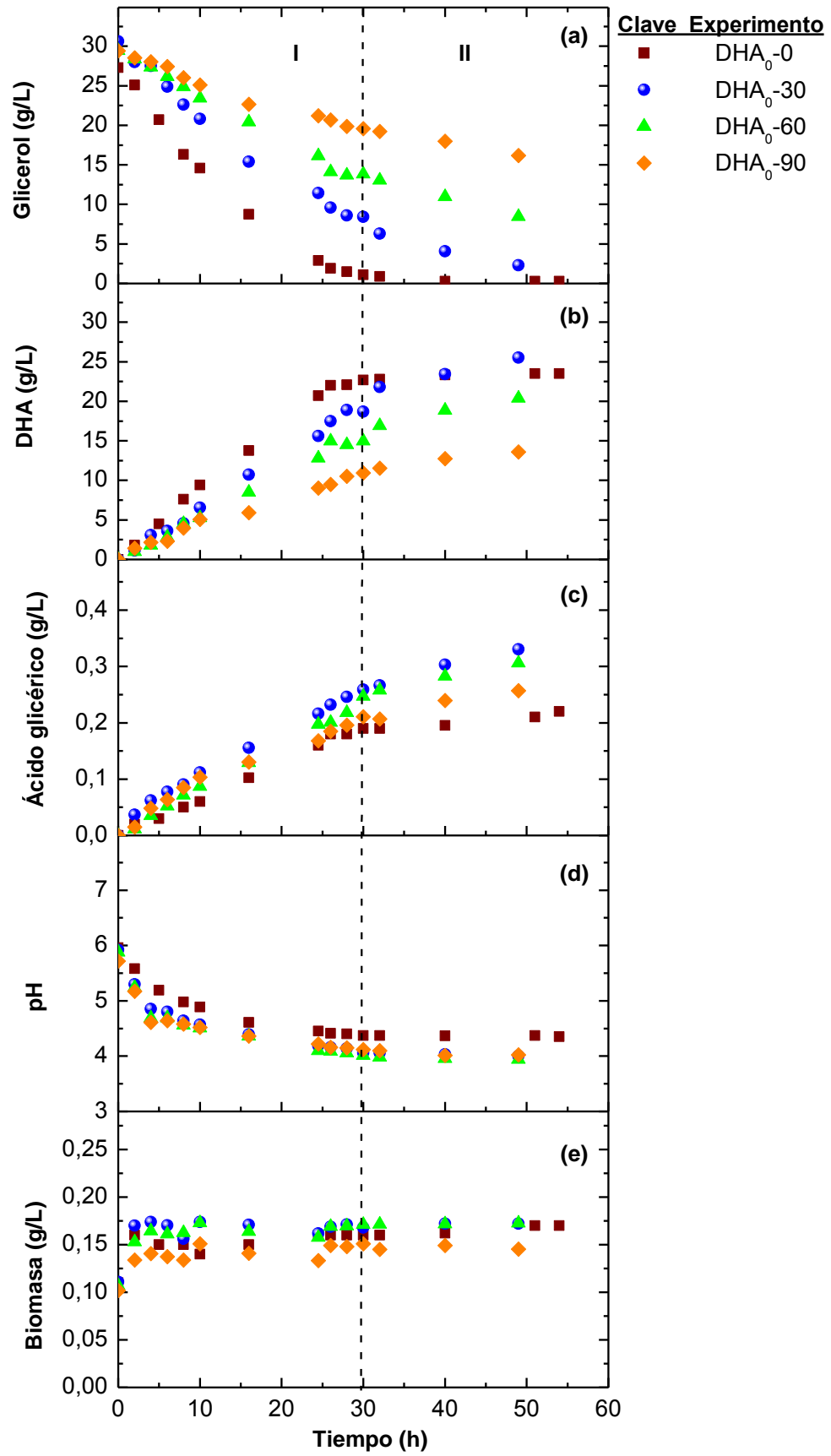


Figura 3.14. Evolución con el tiempo del glicerol (a); la DHA (b); el ácido glicérico (c); el pH (d) y la biomasa (e) para los experimentos DHA_0-0 , DHA_0-30 , DHA_0-60 , DHA_0-90 . La línea discontinua muestra la separación entre las regiones I y II.

Por otro lado, nuevamente se distinguen en la Figura 3.14 dos regiones diferenciadas en la producción de DHA. Durante las primeras 30 horas aproximadamente, la velocidad de producción es constante con el tiempo en todos los experimentos (región I). A partir de entonces, en los experimentos en los que queda glicerol remanente, se aprecia un ligero cambio de pendiente tanto en el consumo de glicerol, como en la producción de DHA, ralentizándose el proceso (región II). Precisamente, este fenómeno también se había detectado previamente en los experimentos con concentraciones crecientes de glicerol (apartado 3.3.2). Tomando como ejemplo el experimento *Glic-80/tamp*, el cual no está afectado por el pH, cabe destacar que la ralentización del proceso en este caso coincidía con una concentración de DHA en el caldo de unos 30 g/L, por lo que se había especulado que la inhibición por producto era la responsable del cambio de tendencia en la velocidad de producción. Sin embargo, en el experimento con una concentración inicial de DHA de 30 g/L (DHA_0-30), la producción comienza siendo lineal a pesar de la presencia de DHA, mientras que la ralentización del proceso observada cuando se alcanza una concentración de 30 g/L de DHA en el experimento *Glic-80/tamp* tiene una tendencia no lineal. Para tratar de esclarecer este punto, se ha representado la DHA medida en el caldo de los dos experimentos citados frente al tiempo, en la Figura 3.15.

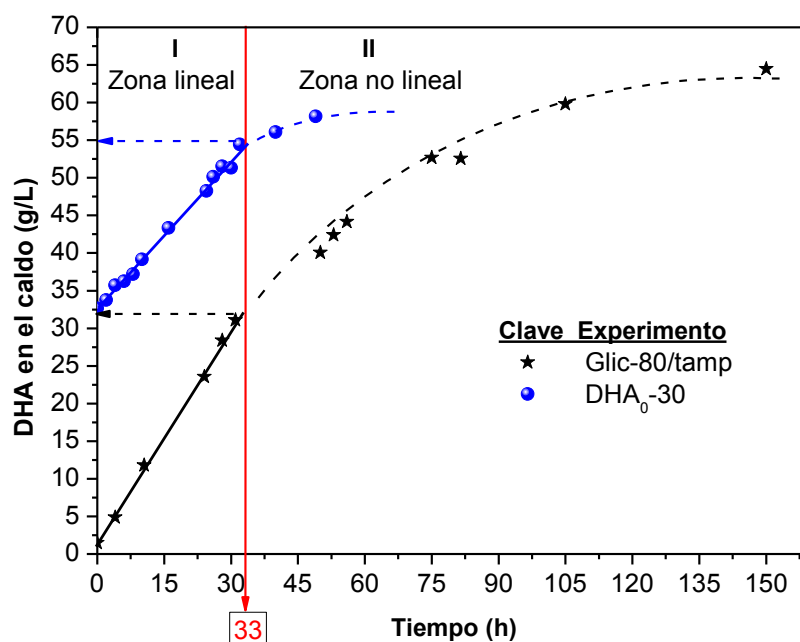


Figura 3.15. Representación gráfica de la DHA presente en el caldo en función del tiempo para los experimentos *Glic-80/tamp* y DHA_0-30 , la línea roja muestra el tiempo en el que se produce la transición entre la zona lineal de producción (región I) y la zona de producción no lineal (región II).

Según se muestra en la Figura 3.15, ambos experimentos tienen en común que la región II (zona de producción no lineal) comienza a partir de las 33 horas, independientemente de la concentración de DHA alcanzada (en el experimento DHA_0-30 es de 55 g/L y en el experimento $Glic-80/tamp$ es de 32,5 g/L). Por lo tanto, aunque una concentración elevada de DHA provoca una disminución de la velocidad de producción, tal y como se observa cualitativamente en la Figura 3.14 (b), no es la responsable del comportamiento no lineal de la producción en la región II, como se había afirmado en el apartado 3.3.2. Varios autores han sugerido que la toxicidad de la DHA aumenta con el tiempo de exposición (Izuo y col., 1980; Hekmat y col., 2003); este hecho podría ser la causa del cambio de tendencia en la producción observada en la región II a partir de las 33 horas de cultivo.

Volviendo al objetivo de este apartado, que es analizar la influencia de la concentración de DHA sobre la velocidad de producción, se ha calculado la velocidad inicial con la que se lleva a cabo el proceso en la región I mediante regresión lineal, para tener una idea de cómo afecta la DHA a la actividad enzimática. En la Figura 3.16 se muestran los ajustes realizados y, en la Tabla 3.27 aparecen los datos numéricos de velocidad de producción de DHA obtenidos a partir de la pendiente, así como la bondad de los ajustes.

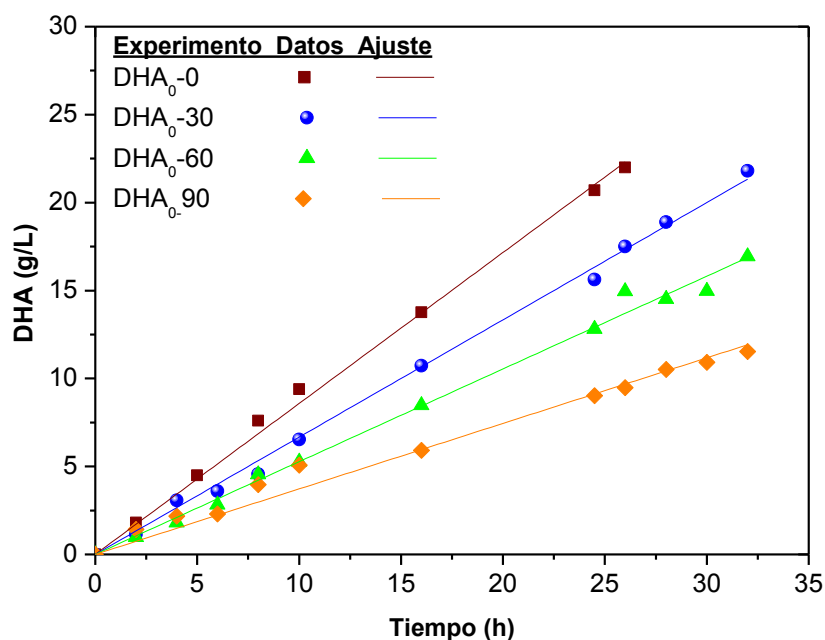


Figura 3.16. Representación de los ajustes lineales de los datos de concentración de DHA frente al tiempo de los experimentos del estudio de inhibición por producto para el cálculo de R_{DHA}^0 .

Tabla 3.27. Velocidad inicial de producción de DHA (R_{DHA}^0) de los experimentos con distinta concentración de DHA inicial.

Experimento	R_{DHA}^0 (g/L·h)	r^2
DHA ₀ -0	0,86	0,999
DHA ₀ -30	0,67	0,999
DHA ₀ -60	0,53	0,998
DHA ₀ -90	0,37	0,993

Los resultados de la tabla anterior muestran un marcado descenso de la velocidad inicial de producción, esto es, de la actividad enzimática, al aumentar la concentración inicial de DHA. Cuando dicha concentración de DHA es de tan sólo 30 g/L, el descenso en la velocidad inicial de producción es del 22% respecto al experimento de control. Ya en diversos estudios se había comprobado que la DHA comienza a afectar a la producción cuando alcanza una concentración de entre 30-40 g/L (Claret y col., 1993; Hekmat y col., 2003; Stasiak-Rozanska y col., 2014), y así se constata.

Por otra parte, para relacionar la actividad enzimática con la concentración de DHA, se han representado ambos parámetros en la Figura 3.17, observándose una disminución lineal de la actividad con la concentración inicial de DHA. Dado que hay una relación evidente entre la velocidad de producción de DHA y su concentración, el modelo propuesto por Hinshelwood (1946) puede ser válido para describir el fenómeno de inhibición por producto observado. Adaptando el modelo de Hinshelwood a este proceso se obtendría la ecuación [3.7]:

$$a_0 = a_0^{\max} \cdot \frac{C_{Glic}^0}{C_{Glic}^0 + k_s} \cdot \left(1 - \frac{C_{DHA}^0}{C_{DHA}^{\max}} \right) \quad [3.7]$$

donde: a_0^{\max} es la velocidad máxima de producción de DHA o actividad enzimática máxima; C_{Glic}^0 es la concentración inicial de glicerol; k_s es la constante de afinidad por el sustrato; C_{DHA}^0 es la concentración inicial de DHA y C_{DHA}^{\max} es la concentración de DHA máxima, a partir de la cual, el proceso cesa.

Sin embargo, la ecuación anterior contempla una influencia de la concentración de glicerol sobre la actividad, que en este proceso no se produce, tal y como se demostró en el apartado 3.3.2. Por lo tanto, se va a suponer que el valor de k_s es despreciable frente a la concentración inicial de glicerol, de modo que la concentración de glicerol no sea un término influyente y la ecuación de Hinshelwood quede reducida a la ecuación [3.8]. Reordenando los términos de dicha ecuación, se pueden obtener los parámetros a_0^{\max} y C_{DHA}^{\max} por regresión lineal. Los resultados se muestran en la Tabla 3.28.

$$a_0 = a_0^{\max} \cdot \left(1 - \frac{C_{DHA}^0}{C_{DHA}^{\max}}\right) \quad \therefore \quad a_0 = a_0^{\max} - \frac{a_0^{\max}}{C_{DHA}^{\max}} \cdot C_{DHA}^0 \quad [3.8]$$

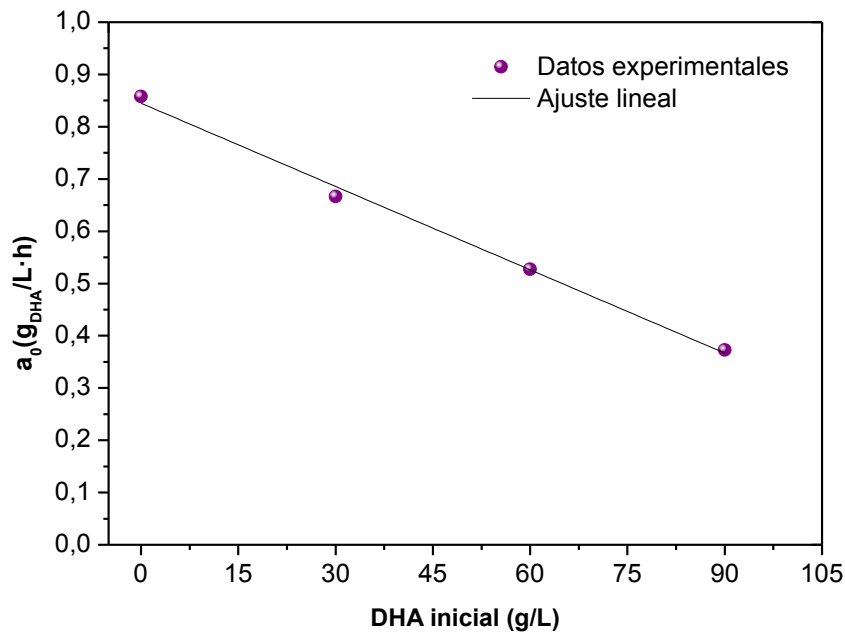


Figura 3.17. Efecto de la concentración inicial de producto sobre la actividad enzimática (a_0).

Tabla 3.28. Parámetros de ajuste de la ecuación de Hinshelwood simplificada.

a_0^{\max} (g _{DHA} /L·h)	C_{DHA}^{\max} (g/L)	r^2
0,85	159,4	0,993

Analizando los resultados del ajuste, expuestos en la Tabla 3.28, se observa que la actividad enzimática máxima predicha (a_0^{\max}) coincide prácticamente con la velocidad inicial de producción (R_{DHA}^0) del experimento que no contiene DHA en el inicio (ver Tabla 3.27). Además, la concentración crítica de DHA, a partir de la cual se produce la inhibición total del proceso (C_{DHA}^{\max}), se ha estimado en 159 g/L. Este resultado es consistente con un estudio publicado por Bauer y col. (2005), en el cual, se comprueba que concentraciones mayores de 160 g/L de DHA provocan una inhibición total e irreversible del proceso. No obstante, según los mismos autores, debido a la robustez de la enzima glicerol deshidrogenasa, la producción de DHA puede continuar hasta alcanzar una concentración de hasta 220 g/L aunque las células estén dañadas. En cualquier caso, la ecuación propuesta para describir el fenómeno de inhibición por producto conduce a buenas predicciones, como se observa en la Figura 3.17.

En bibliografía se han descrito diversas alternativas para tratar de paliar los efectos negativos asociados a la inhibición por producto. La mutación genética de *G. oxydans* es una de ellas. Así, se han realizado mutaciones dirigidas para aumentar la actividad enzimática y disminuir la velocidad de inactivación (Gaetgens y col., 2007; Habe y col., 2010; Li y col., 2010a) y mutaciones al azar mediante radiación ultravioleta para generar cepas resistentes a la DHA (Ma y col., 2010; Hu y Zheng, 2011). Además, se han propuesto nuevas formas de operación para conseguir altas concentraciones de DHA en el medio. Por ejemplo, la operación semicontinua en dos etapas en modo *repeated fed-batch*. Para ello, se dispone de dos reactores en serie, en el primero se opera en modo *fed-batch* hasta alcanzar una concentración de DHA por debajo del umbral inhibitorio y, a continuación, el 95% de este caldo viable se trasvasa al segundo reactor para que continúe el bioproceso hasta alcanzar una concentración de DHA elevada. Mientras tanto, el primer reactor se alimenta con medio fresco, actuando como inóculo el 5% del caldo restante. De este modo, en el segundo reactor se llegan a alcanzar concentraciones de producto de hasta 220 g/L, aunque el cultivo esté completa e irreversiblemente inhibido (Bauer y col., 2005). Por otro lado, la inmovilización de las células en soportes poliméricos apropiados puede disminuir los efectos inhibitorios, ya que evita el contacto directo con el producto y proporciona un ambiente protector para las células (Cassidy y col., 1996). De todos los materiales ensayados (poliacrilamida, polivinilalcohol, k-carragenato, alginato etc.), el que mejores propiedades presenta es el alcohol polivinílico (PVA) por ser no tóxico, económico y altamente resistente para

soportar los esfuerzos de cizalla producidos en el biorreactor (Wei y col., 2007b). Aunque, en estos sistemas, el principal problema radica en el insuficiente aporte de oxígeno a las células debido a problemas difusionales, usando matrices de silicona con alta permeabilidad al oxígeno se ha conseguido reducir este efecto (Hekmat y col., 2007; Lidia y Stanislaw, 2012). En Capítulos posteriores se tendrán en cuenta estas propuestas para realizar ensayos con células inmovilizadas enfocados a la disminución de la inhibición por producto, ya que ha resultado ser uno de los puntos débiles del proceso, junto con la acidificación del medio hacia valores de pH por debajo de 4 y la presencia de un factor limitante aún no determinado que evita que el proceso transcurra proporcionalmente más rápido al incrementar la cantidad de biomasa.

Asimismo, en este apartado se ha comprobado que la velocidad de producción es un parámetro importante, ya que el tiempo de exposición a la DHA también juega un papel esencial en la inhibición de la producción. Por lo tanto, aumentando la velocidad de producción y, por ende, disminuyendo el tiempo requerido para la biotransformación y el tiempo de exposición de las células a la DHA se podrían minimizar los efectos inhibitorios. Por esta razón, el estudio de las condiciones de operación resulta de gran importancia por su implicación directa en la velocidad de producción y se abordará en el siguiente Capítulo.

3.5 EMPLEO DE GLICEROL CRUDO

La motivación de la presente Tesis Doctoral es, en última instancia, el desarrollo de un proceso de revalorización de glicerol crudo para obtener un producto de alto valor añadido como es la DHA. En los estudios anteriores se ha empleado glicerol puro para poder evaluar los efectos de la fuente compleja, la concentración de sustrato y la concentración de producto sobre la producción de DHA de manera aislada sin ningún tipo de interferencia. Sin embargo, la presencia de impurezas en el glicerol crudo podría tener efectos negativos sobre la producción de DHA. Así, Liebming y col. (2014) observaron una disminución de la conversión en el citado proceso al emplear glicerol crudo debido, probablemente, a las impurezas presentes en el mismo. Por el contrario, Liu y col. (2013) no hallaron grandes diferencias entre el uso de glicerol puro y crudo en términos de producción de DHA. Aun así, comprobaron que las elevadas concentraciones de iones sodio presentes en el glicerol crudo podrían afectar

ligeramente a la producción, ya que estos iones están involucrados en la formación del gradiente transmembrana de pH, la movilidad celular y la regulación interna del pH. Por otro lado, el metanol, que constituye otra de las principales impurezas del glicerol crudo, parece inhibir la formación de ácido glicérico, pudiendo mejorar así el proceso productivo de DHA (Sato y col., 2013). No obstante, en este estudio se eliminó el metanol del glicerol crudo, dado que puede llegar a ser tóxico para el microorganismo.

En cualquier caso, en bibliografía no parece haber un consenso acerca del efecto que provoca la sustitución de glicerol puro por crudo en la producción de DHA con *G. oxydans*. Por ello, se ha considerado de interés la realización de un conjunto de experimentos con glicerol crudo procedente de una industria de producción de biodiésel (Biocom Energía S.L), cuya composición se muestra en la Tabla 2.2 del Capítulo 2, para determinar si existen realmente diferencias significativas en la producción de DHA cuando se emplea este tipo de glicerol respecto al empleo del sustrato puro. Para ello, se han realizado sendos experimentos con glicerol puro y crudo en las mismas condiciones experimentales. Esto es, en matraz *Erlenmeyer*, con una concentración de glicerol de 25 g/L, sin adición de extracto de levadura ni peptona, sin ajuste del pH inicial, a 30 °C y 200 rpm. Sin embargo, el pH inicial del medio con glicerol crudo resultó ser más bajo de lo esperado. Por lo tanto, se realizó otro experimento idéntico pero ajustando el pH inicial del medio a 6,5 para evitar una influencia negativa del pH. Por otro lado, se han realizado experimentos con distintas concentraciones iniciales de glicerol crudo para determinar si se dan efectos inhibitorios al aumentar la concentración de impurezas. En la Tabla 3.29 se muestra la planificación experimental y el código de cada experimento.

Tabla 3.29. Planificación experimental para el estudio del efecto del glicerol crudo sobre la producción de DHA.

Experimento	Tipo de glicerol	Concentración de glicerol (g/L)	pH ₀
Glic-30/puro	Puro	30	s.a. ¹
Glic-30/crudo	Crudo	30	s.a
Glic-30/crudo	Crudo	30	6,5
Glic-45/crudo	Crudo	45	6,5
Glic-65/crudo	Crudo	65	6,5

¹s.a = pH₀ sin ajustar; esto es, pH resultante tras la formulación del medio.

3.5.1 Resultados experimentales

Las tablas de resultados experimentales muestran la evolución con el tiempo de la concentración de biomasa, glicerol, DHA, ácido glicérico y del pH en los distintos experimentos. En la Tabla 3.30 se muestran los resultados del experimento de referencia con glicerol puro, mientras que en las Tablas 3.31 y 3.32, se muestran los datos de los experimentos llevados a cabo con glicerol crudo pero sin ajuste y con ajuste del pH inicial, respectivamente. Por otro lado, las Tablas 3.33 y 3.34, muestran los resultados de los experimentos con mayor concentración de glicerol crudo.

Tabla 3.30. Resultados del experimento Glic-30/puro s.a (30 g/L de glicerol puro). Condiciones: 30 °C, 200 rpm, pH libre, 20 % v/v inóculo.

Tiempo [h]	Biomasa [g/L]	pH	Glicerol [g/L]	DHA producida [g/L]	Ácido glicérico producido [g/L]
0	0,11	5,96	27,34	0,00	0,00
2	0,16	5,58	25,05	1,80	0,02
5	0,15	5,19	20,74	4,53	0,03
8	0,15	4,98	16,27	7,61	0,05
10	0,14	4,89	14,64	9,44	0,06
15	0,15	4,76	8,40	13,85	0,10
20	0,15	4,56	3,28	18,33	0,14
24,5	0,16	4,45	2,88	20,70	0,16
26	0,16	4,41	1,95	22,02	0,18
28	0,16	4,40	1,50	22,10	0,18
30	0,16	4,37	1,11	22,71	0,19
32	0,16	4,37	0,85	22,77	0,19
51	0,17	4,37	0,32	23,47	0,21
54	0,17	4,35	0,32	23,53	0,22

Tabla 3.31. Resultados del experimento Glic-30/crudo s.a (30 g/L de glicerol crudo). Condiciones: 30 °C, 200 rpm, pH libre, 20 % v/v inóculo.

Tiempo [h]	Biomasa [g/L]	pH	Glicerol [g/L]	DHA producida [g/L]	Ácido glicérico producido [g/L]
0	0,13	4,41	30,24	0,00	0,00
2	0,15	4,36	29,06	1,41	0,02
4	0,22	4,22	24,69	3,74	0,05
6	0,30	4,02	16,38	6,78	0,07
8	0,32	3,97	15,74	8,55	0,10
9,5	0,30	3,91	10,67	12,21	0,12
15	0,33	3,79	3,83	15,56	0,17
20	0,33	3,74	1,27	19,95	0,20
24	0,34	3,75	0,52	21,34	0,22
26	0,33	3,77	0,53	22,04	0,24
28	0,34	3,76	0,45	21,05	0,25
30	0,31	3,81	0,33	21,59	0,22
32	0,35	3,72	0,42	21,68	0,29
49	0,33	3,72	0,25	21,63	0,25

Tabla 3.32. Resultados del experimento Glic-30/crudo 6,5 (30 g/L de glicerol crudo). Condiciones: 30 °C, 200 rpm, $pH_0 = 6,5$, 20 % v/v inóculo.

Tiempo [h]	Biomasa [g/L]	pH	Glicerol [g/L]	DHA producida [g/L]	Ácido glicérico producido [g/L]
0	0,12	6,59	32,59	0,00	0,00
2	0,16	6,49	27,07	1,16	0,05
4	0,26	6,23	22,75	2,67	0,10
6	0,27	5,9	19,20	4,09	0,15
8	0,25	5,51	17,14	7,16	0,24
9,5	0,24	5,31	14,54	8,71	0,27
15	0,36	4,67	4,94	13,18	0,36
20	0,39	4,46	2,20	17,76	0,42
24	0,39	4,49	0,38	21,42	0,46
26	0,42	4,49	0,12	20,77	0,41
28	0,43	4,46	0,09	21,25	0,43
30	0,42	4,42	0,10	21,14	0,44
49	0,43	4,29	0,09	21,25	0,59

Tabla 3.33. Resultados del experimento Glic-45/crudo 6,5 (45 g/L de glicerol crudo). Condiciones: 30 °C, 200 rpm, $pH_0 = 6,5$, 20 % v/v inóculo.

Tiempo [h]	Biomasa [g/L]	pH	Glicerol [g/L]	DHA producida [g/L]	Ácido glicérico producido [g/L]
0	0,13	6,63	44,87	0,00	0,00
2	0,16	6,56	44,60	0,78	0,06
4	0,22	6,38	42,44	2,09	0,12
6	0,35	6,06	40,51	3,76	0,26
8	0,43	5,42	38,57	5,76	0,46
9,5	0,46	5,15	38,49	5,63	0,54
15	0,51	4,33	30,24	11,34	0,98
20	0,54	4,11	24,24	15,73	1,33
24	0,47	3,99	19,32	22,68	1,37
26	0,53	3,96	17,78	24,17	1,43
28	0,49	3,99	12,05	29,28	1,34
30	0,54	3,94	10,99	30,33	1,41
32	0,53	3,86	10,82	31,21	1,41
49	0,57	3,74	5,31	35,68	1,60

Tabla 3.34. Resultados del experimento Glic-65/crudo 6,5 (65 g/L de glicerol crudo). Condiciones: 30 °C, 200 rpm, $pH_0 = 6,5$, 20 % v/v inóculo.

Tiempo [h]	Biomasa [g/L]	pH	Glicerol [g/L]	DHA producida [g/L]	Ácido glicérico producido [g/L]
0	0,14	6,67	64,56	0,00	0,00
2	0,16	6,63	64,07	0,62	0,08
4	0,19	6,51	62,40	1,27	0,16
6	0,24	6,31	61,86	2,20	0,28
8	0,34	5,96	59,98	3,73	0,48
9,5	0,39	5,49	58,87	4,90	0,62
15	0,67	4,07	53,71	9,49	1,55
20	0,87	3,79	47,39	13,71	2,22
24	0,99	3,66	41,74	18,59	2,76
26	1,05	3,62	41,49	19,25	2,92
28	1,06	3,56	38,73	21,21	2,97
30	0,99	3,56	40,05	20,10	2,82
32	1,00	3,52	39,29	20,69	2,88

3.5.2 Discusión de los resultados

En la Figura 3.18 se han representado los resultados experimentales correspondientes a los ensayos con glicerol puro y crudo sin ajuste del pH inicial, mientras que la Figura 3.19 muestra los resultados de los experimentos con glicerol crudo con ajuste y sin ajuste del pH inicial. De este modo, se pueden realizar dos comparaciones, la primera de ellas entre el glicerol puro y crudo, y la segunda de ellas, entre los experimentos con ajuste y sin ajuste de pH inicial, para ver la influencia de esta variable en el proceso.

Comparando los experimentos *Glic-30/puro s.a* y *Glic-30/crudo s.a* (sin ajuste inicial de pH), representados en la Figura 3.18, no se aprecian diferencias significativas ni en el consumo de glicerol ni en la producción de DHA, a pesar de que el pH inicial de ambos experimentos es bastante diferente. Sin embargo, la producción tanto de ácido glicérico, como de biomasa es ligeramente superior en el experimento con glicerol crudo. Esta relación entre la producción de biomasa y ácido glicérico ya se observó con anterioridad: a mayor concentración de biomasa, mayor producción de ácido (ver Figura 3.1). Otro aspecto relevante es que, aunque la producción de ácido glicérico es superior en el experimento con glicerol crudo, la caída de pH no es tan acusada. El pH cae únicamente 0,79 puntos en este experimento, mientras que en el experimento con glicerol puro la caída es de 1,61 (ver Tablas 3.31 y 3.30, respectivamente). La explicación más razonable para estas observaciones podría radicar en el alto contenido en fosfatos que presenta el glicerol crudo. Por un lado, los fosfatos estarían ejerciendo un efecto tampón en el pH y por otro lado, estarían favoreciendo el crecimiento de *G. oxydans*.

En términos cuantitativos, en el experimento con glicerol crudo se alcanza el doble de concentración de biomasa que en el experimento con glicerol puro (0,34 frente a 0,17 g/L). Aun así, la velocidad de producción de DHA es muy similar en ambos experimentos. Nuevamente se pone de manifiesto lo que se observaba en el apartado 3.2.3, que concentraciones de biomasa superiores a 0,2 g/L no conducen a un aumento en la velocidad de producción de DHA, como cabría esperar. Por lo tanto, en este caso también se estaría dando algún fenómeno limitante de la producción, aún sin identificar.

En vista de los resultados, se puede concluir que no existen diferencias significativas en términos de producción de DHA al reemplazar el glicerol puro por crudo, al igual que se afirmaba en el estudio realizado por Liu y col. (2013).

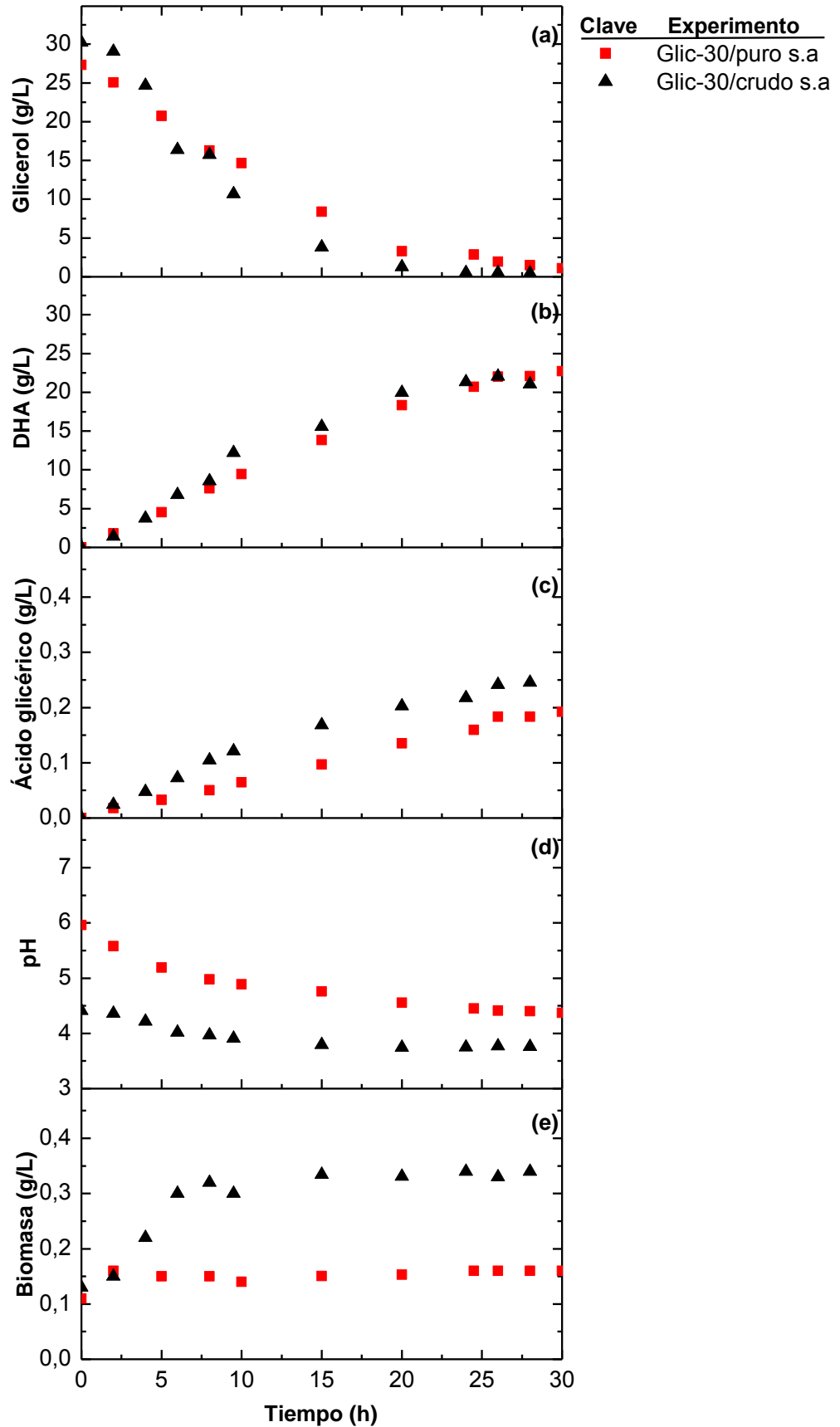


Figura 3.18. Evolución con el tiempo del glicerol (a); la DHA (b); el ácido glicérico (c); el pH (d) y la biomasa (e) para los experimentos Glic-30/puro s.a y Glic-30/crudo s.a.

No obstante, como se ha indicado previamente, dado que el pH resultante al formular el medio con glicerol crudo es bastante bajo, ligeramente superior a 4 (Tabla 3.31), se ha considerado de interés la realización de otro experimento con glicerol crudo pero ajustando el pH inicial a 6,5. En la Figura 3.19 se muestra de forma comparativa los resultados de los experimentos llevados a cabo sin ajuste y con ajuste de pH inicial (*Glic-30/crudo s.a* y *Glic-30/crudo 6,5*).

Es destacable que, en ambos casos, la evolución del glicerol es muy semejante, al igual que ocurre con la evolución de la producción de DHA, por lo que el pH inicial no parece ser un factor influyente en términos de producción de DHA. Además, el pH final en el experimento *Glic-30/crudo s.a* apenas baja de 4 cuando se agota el glicerol. De este modo, no se observa el fenómeno descrito en el apartado 3.3.2 relativo a la parada de la producción a causa de una bajada acusada del pH por debajo de 3,73-4.

En lo que respecta a la biomasa, su producción es un 25% superior en el experimento con ajuste de pH a un valor inicial más alto, aunque esto no se traduce en una mayor velocidad de producción de DHA (como ya sucedía en experimentos anteriores). Matsushita y col. (1989) estudiaron el efecto del pH extracelular sobre la cadena respiratoria de *G. oxydans* y comprobaron que valores bajos de pH disminuían la eficiencia en la translocación de protones (ratio H^+/e^-), proceso responsable de la generación del gradiente electroquímico necesario para la síntesis de ATP. Esto explicaría la menor generación de biomasa en el experimento sin ajuste inicial de pH.

En cuanto a la producción de ácido glicérico, las diferencias son mayores. Dicha producción parece estar favorecida a pH iniciales más altos, ya que en el experimento *Glic-30/crudo 6,5* la producción es 1,7 veces superior que en el mismo experimento sin ajuste inicial de pH. Estas observaciones son consistentes con la publicación de Habe y col. (2009), en la cual se comprueba que el control de pH mejora considerablemente la producción de ácido glicérico a partir de glicerol crudo. Por lo tanto, con vistas al desarrollo de un proceso productivo de DHA es recomendable operar con valores bajos de pH inicial para minimizar la producción de ácido glicérico y facilitar así la purificación posterior del producto de interés.

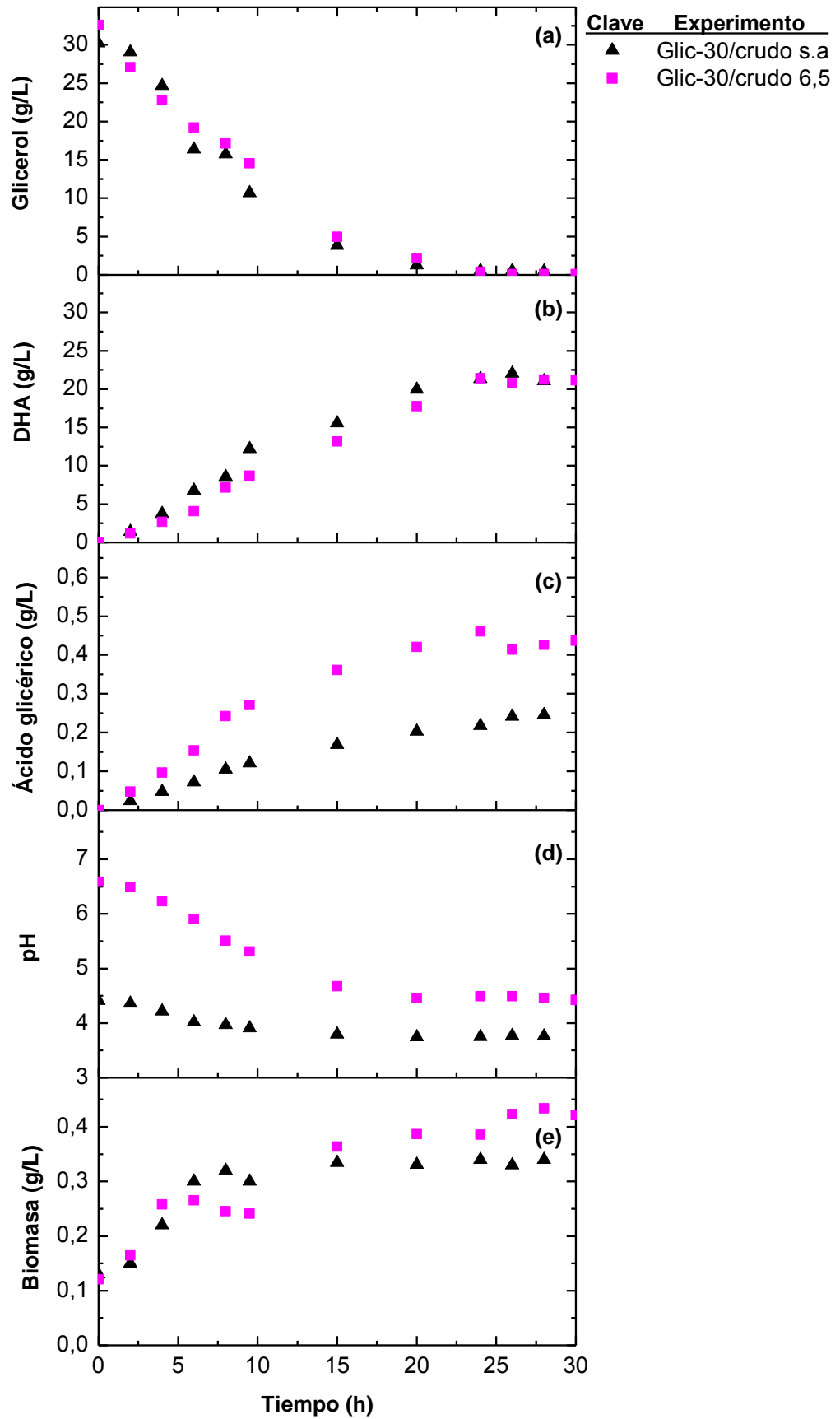


Figura 3.19. Evolución con el tiempo del glicerol (a); la DHA (b); el ácido glicérico (c); el pH (d) y la biomasa (e) para los experimentos Glic-30/crudo s.a y Glic-30/crudo 6,5.

Por último, se han representado en la Figura 3.20 los resultados experimentales de los experimentos con concentraciones crecientes de glicerol crudo; *Glic-30/crudo* 6,5, *Glic-45/crudo* 6,5 y *Glic-65/crudo* 6,5. En estos experimentos se ha ajustado el pH inicial a 6,5 para evitar una bajada del mismo hacia valores críticos, ya que, como se mencionó en el apartado 3.3.2, al incrementarse la concentración de glicerol aumenta la producción de ácido glicérico y, por tanto, la acidificación del medio. No se ha considerado adecuada la adición de ningún tampón para evitar interferencias y poder evaluar el efecto de las impurezas del glicerol crudo al aumentar su concentración.

Atendiendo a la Figura 3.20 (a), se observa que únicamente se consume todo el glicerol en el experimento *Glic-30/crudo* 6,5, mientras que en los otros dos sigue quedando glicerol remanente a tiempos largos. Examinando la evolución del pH (Figura 3.20 (d)), cabe destacar que el pH baja de 4 en estos dos últimos experimentos, a pesar de haberlo ajustado inicialmente a un valor alto, o precisamente por ello, ya que pH altos favorecen la producción de ácido glicérico, tal y como se vio anteriormente. Por otro lado, en la Figura 3.20 (c) se muestra una mayor producción de este ácido al aumentar la concentración inicial de glicerol, al igual que ocurría con el glicerol puro. Sin embargo, aunque esta tendencia es idéntica con ambos tipos de glicerol, la producción total de ácido glicérico es mayor en el experimento con glicerol crudo. En dicho experimento (*Glic-65/crudo* 6,5), con un pH inicial de 6,5, se producen casi 3 g/L de ácido glicérico, mientras que en el experimento con mayor concentración de glicerol puro (*Glic-133*), cuyo pH inicial es de 5,9, la producción no llega a alcanzar este valor, a pesar de que la concentración inicial de glicerol es el doble. De nuevo, se pone de manifiesto la importancia del pH inicial en la formación de subproducto.

El crecimiento de la biomasa se ve favorecido al aumentar la concentración inicial de glicerol crudo, según muestra la Figura 3.20 (e). Esta tendencia no fue observada en el caso de aumentar la concentración inicial de glicerol puro. Además, la concentración máxima de biomasa registrada en el estudio con glicerol crudo es casi el triple que la biomasa máxima obtenida en el estudio de inhibición por sustrato, realizado con glicerol puro (Figura 3.7 (e)). Esto indica que las impurezas presentes en el glicerol crudo (fosfatos y otras sales) influyen positivamente en el crecimiento de la biomasa, tanto más, cuanto mayor es su concentración. Sin embargo, esto no se refleja en la producción de DHA, cuya velocidad inicial parece verse algo mermada al aumentar la concentración de glicerol crudo, según se observa en la Figura 3.20 (b).

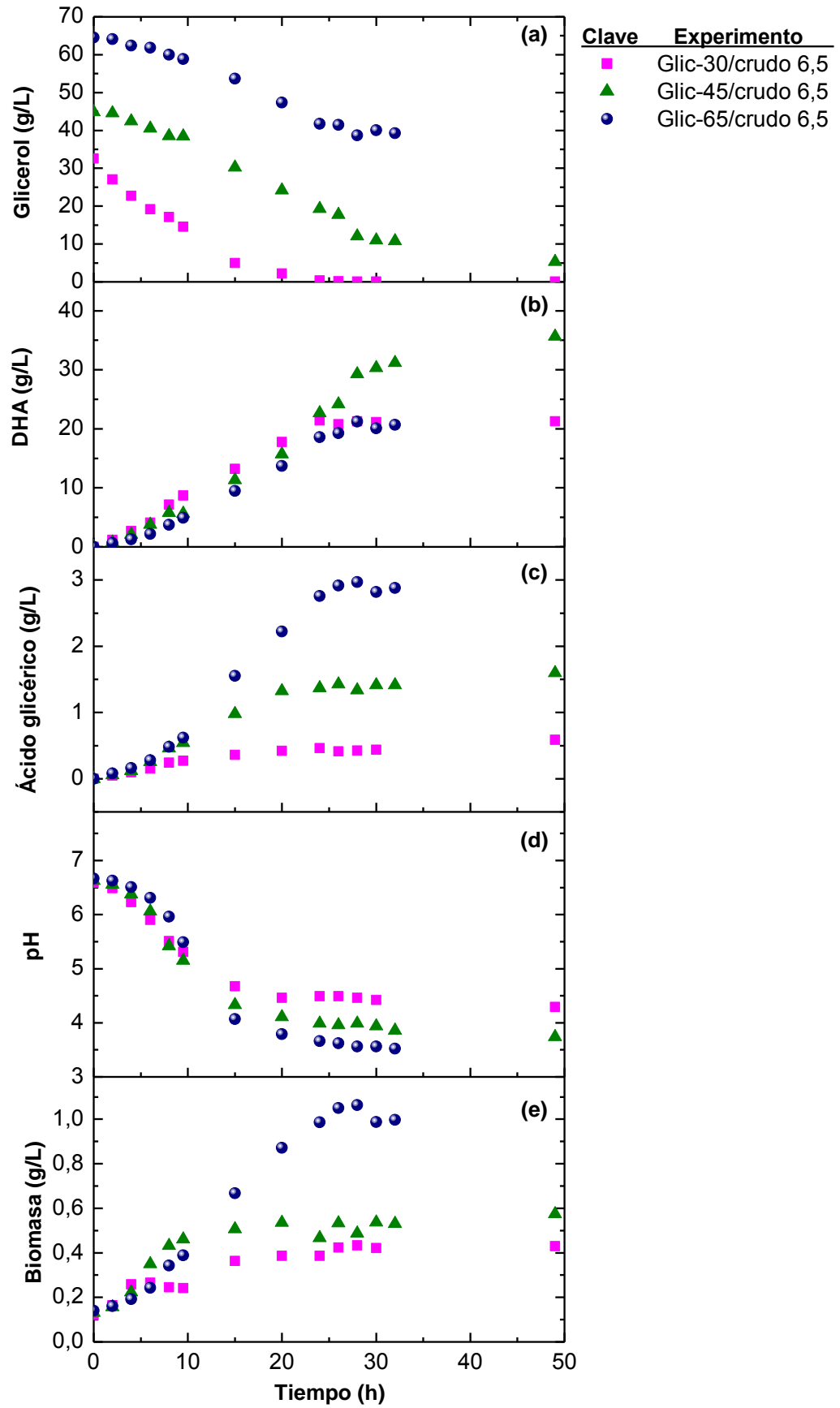


Figura 3.20. Evolución con el tiempo del glicerol (a); la DHA (b); el ácido glicérico (c); el pH (d) y la biomasa (e) para los experimentos Glic-30/crudo 6,5, Glic-45/crudo 6,5 y Glic-65/crudo 6,5.

Para confirmar cuantitativamente la afirmación realizada en el párrafo anterior, acerca de la velocidad de producción de DHA, se han llevado a cabo sendos ajustes lineales para los experimentos con concentraciones crecientes de glicerol crudo durante las primeras horas de transformación. Únicamente se han considerado las primeras horas del proceso en el cálculo de la velocidad inicial de producción de DHA para poder comparar el efecto de las impurezas sobre esta variable y evitar interferencias con otros fenómenos, como la bajada del pH, que se producen en horas más tardías. En la Figura 3.21 se pueden apreciar los ajustes realizados, mientras que en la Tabla 3.35 se pueden consultar los datos numéricos, tanto de velocidad inicial de producción de DHA, obtenida a partir de la pendiente de los ajustes, como de bondad de los ajustes, expresada mediante el coeficiente de correlación. Hay que señalar que los ajustes no son demasiado buenos ($r^2 < 0,99$), probablemente debido a que la tendencia no es lineal, pero este aspecto se abordará más adelante en el Apartado de obtención del modelo cinético correspondiente (Capítulo 6). Sin embargo, en lo que respecta a este análisis, los resultados de R_{DHA}^0 proporcionan una idea de la actividad global en cada uno de los experimentos.

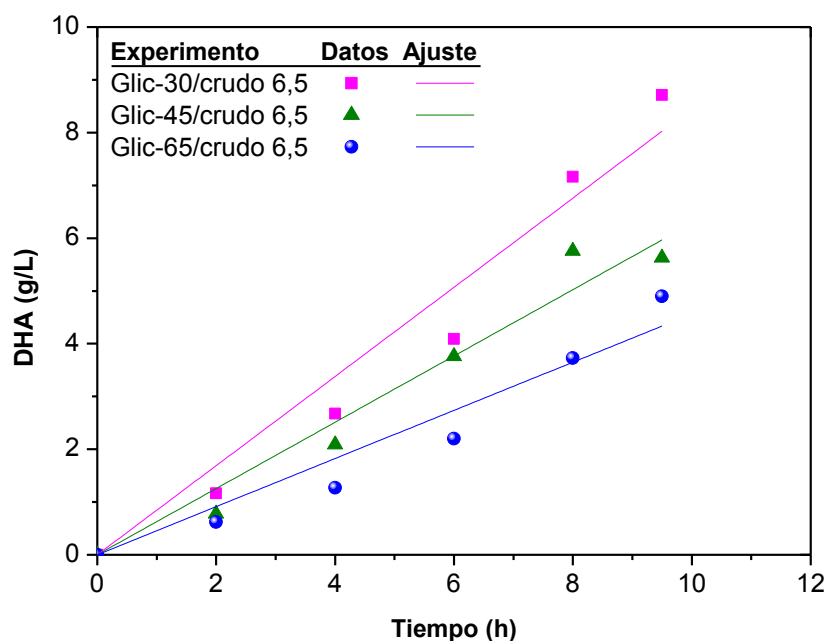


Figura 3.21. Representación de los ajustes lineales de los datos de concentración de DHA frente al tiempo de los experimentos Glic-30/crudo 6,5, Glic-45/crudo 6,5 y Glic-65/crudo 6,5 para el cálculo de R_{DHA}^0 .

Comparando los datos de la Tabla 3.35 se puede afirmar que existe una disminución considerable de la actividad enzimática al aumentar la concentración inicial de glicerol crudo y, por consiguiente, al aumentar la concentración de las impurezas. Esta tendencia se puede visualizar también en la Figura 3.22.

Tabla 3.35. Velocidad inicial de producción de DHA (R_{DHA}^0) de cada uno de los experimentos con distinta concentración de glicerol crudo.

Experimento	R_{DHA}^0 (g/L·h)	r^2
Glic-30/crudo 6,5	0,84	0,981
Glic-45/crudo 6,5	0,63	0,985
Glic-65/crudo 6,5	0,46	0,973

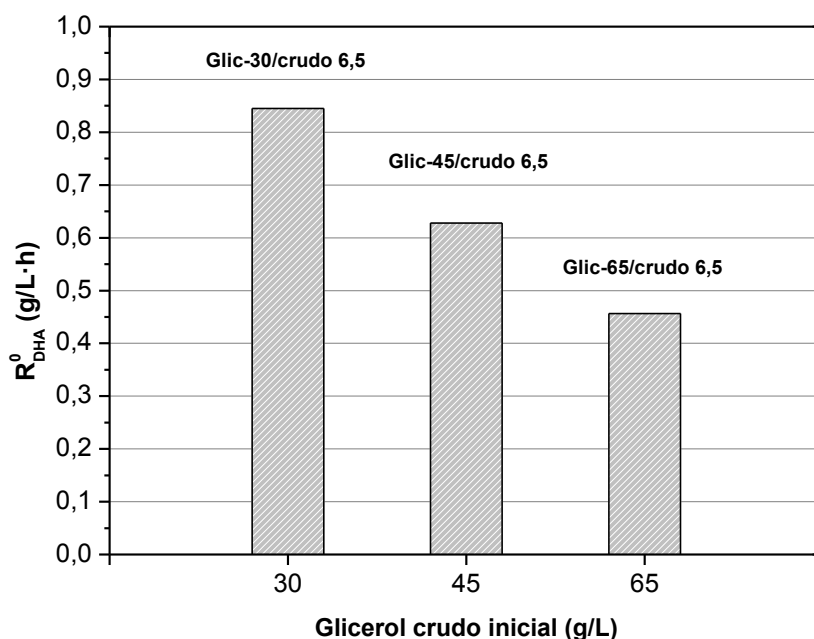


Figura 3.22. Efecto de la concentración inicial de glicerol crudo sobre la velocidad de producción de DHA inicial (R_{DHA}^0).

En el estudio de inhibición por sustrato, mostrado en el apartado 3.3.2, la velocidad de producción de DHA en la región I (durante las primeras horas de reacción) era muy similar en todos los experimentos, independientemente de la concentración inicial de glicerol puro (ver Figura 3.10). Por lo tanto, el descenso de la velocidad de

producción de DHA cuando se emplean concentraciones crecientes de glicerol crudo únicamente se puede achacar a las impurezas presentes. No obstante, cabe señalar que las impurezas comienzan a afectar a la velocidad de producción de DHA a partir de un valor comprendido entre 30 y 45 g/L de glicerol crudo, tal y como se observa en la Figura 3.22. Sin embargo, no hay diferencias significativas entre los dos tipos de glicerol cuando la concentración es de 30 g/L (ver la Figura 3.18 (b)).

Finalmente, para tratar de esclarecer el fenómeno observado en la Figura 3.20 (a), respecto a la parada en el consumo de glicerol, acaecida en los experimentos *Glic-45/crudo 6,5* y *Glic-65/crudo 6,5*, se ha representado la conversión de cada experimento, calculada mediante la ecuación [3.6], frente al pH final. De esta manera, se pretende establecer un vínculo entre ambos parámetros, al igual que se hizo en el estudio de inhibición por sustrato. Los resultados se muestran en la Figura 3.23.

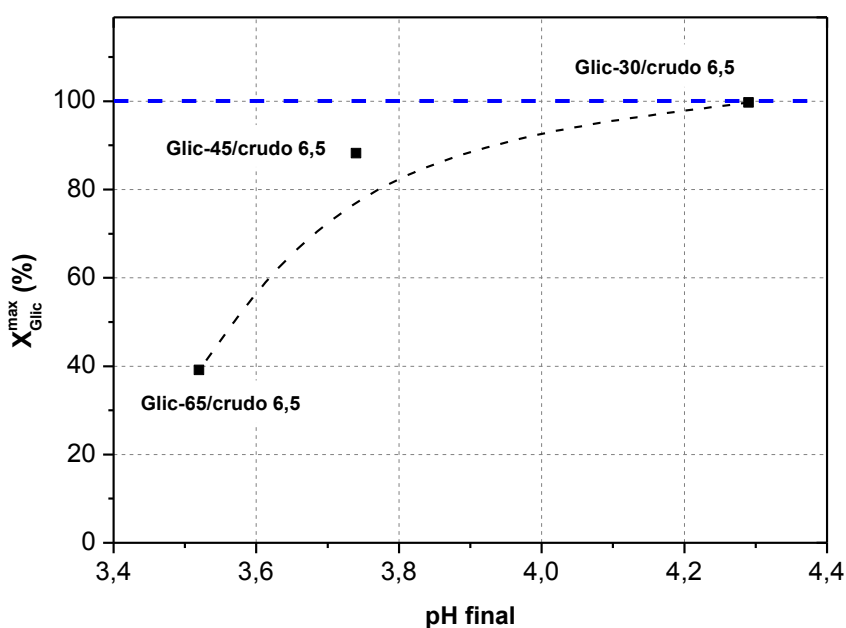


Figura 3.23. Representación gráfica de la relación entre el pH final del caldo y el porcentaje de glicerol consumido para los experimentos *Glic-30/crudo 6,5*, *Glic-45/crudo 6,5* y *Glic-65/crudo 6,5*.

Efectivamente, como se puede observar en la Figura 3.23, existe una relación clara entre la conversión de cada experimento y el pH final. A medida que disminuye el pH final, también lo hace la conversión. La conversión completa (100 %) únicamente se alcanza en el experimento con 30 g/L de glicerol crudo, *Glic-30/crudo 6,5*. El intervalo

en el que puede establecerse el valor crítico de pH, a partir del cual el proceso se detiene, es análogo al que se observó en el estudio de inhibición por sustrato con glicerol puro (ver Figura 3.11). Este valor crítico de pH está comprendido entre 4,3 y 3,7, que son los valores de pH correspondientes a los experimentos *Glic-30/crudo* 6,5 (100% de conversión) y *Glic-45/crudo* 6,5 (88% de conversión), respectivamente. Por lo tanto, los fenómenos detectados en los estudios anteriores con glicerol puro también se dan en la misma medida cuando se emplea glicerol crudo. Este hecho es relevante, pues significa que toda la información obtenida en los estudios anteriores con glicerol puro, es válida también para el glicerol crudo. No obstante, hay que recalcar de nuevo que el arrastre de impurezas cuando se emplea glicerol crudo en concentraciones superiores a 30 g/L favorece la producción de ácido glicérico y de biomasa, en perjuicio de la producción de DHA. Por ello, la producción de DHA con glicerol crudo sólo es equiparable a la producción con glicerol puro cuando la concentración del mismo es de 30 g/L.

3.6 BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Batzing, B.L., Claus, G.W. 1973. Fine-structural changes of *Acetobacter suboxydans* during growth in a defined medium. *Journal of Bacteriology*, **113**(3), 1455-1461.
- Bauer, R., Hekmat, D. 2006. Development of a transient segregated mathematical model of the semicontinuous microbial production process of dihydroxyacetone. *Biotechnology Progress*, **22**(1), 278-284.
- Bauer, R., Katsikis, N., Varga, S., Hekmat, D. 2005. Study of the inhibitory effect of the product dihydroxyacetone on *Gluconobacter oxydans* in a semi-continuous two-stage repeated-fed-batch process. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, **28**(1), 37-43.
- Belly, R.T., Claus, G.W. 1972. Effect of amino-acids on growth of *Acetobacter suboxydans*. *Archiv Fur Mikrobiologie*, **83**(3), 237-&.
- Bories, A., Claret, C., Soucaille, P. 1991. Kinetic-study and optimization of the production of dihydroxyacetone from glycerol using *Gluconobacter oxydans*. *Process Biochemistry*, **26**(4), 243-248.
- Cassidy, M.B., Lee, H., Trevors, J.T. 1996. Environmental applications of immobilized microbial cells: A review. *Journal of Industrial Microbiology*, **16**(2), 79-101.
- Claret, C., Bories, A., Soucaille, P. 1992. Glycerol inhibition of growth and dihydroxyacetone production by *Gluconobacter oxydans*. *Current Microbiology*, **25**(3), 149-155.
- Claret, C., Bories, A., Soucaille, P. 1993. Inhibitory effect of dihydroxyacetone on *Gluconobacter oxydans* - kinetic aspects and expression by mathematical equations. *Journal of Industrial Microbiology*, **11**(2), 105-112.
- Claret, C., Salmon, J.M., Romieu, C., Bories, A. 1994. Physiology of *Gluconobacter oxydans* during dihydroxyacetone production from glycerol. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **41**(3), 359-365.

- Claus, G.W., Batzing, B.L., Baker, C.A., Goebel, E.M. 1975. Intracytoplasmic membrane formation and increased oxidation of glycerol during growth of *Gluconobacter oxydans*. *Journal of Bacteriology*, **123**(3), 1169-1183.
- Cota-Robles E. 1966. Internal membranes in cells of escherichia coli. *Journal of Ultrastructure Research*, **16**(5-6), 626-639.
- Flickinger, M.C., Perlman, D. 1977. Application of oxygen-enriched aeration in conversion of glycerol to dihydroxyacetone by *Gluconobacter melanogenus* IFO-3293. *Applied and Environmental Microbiology*, **33**(3), 706-712.
- Gaetgens, C., Degner, U., Bringer-Meyer, S., Herrmann, U. 2007. Biotransformation of glycerol to dihydroxyacetone by recombinant *Gluconobacter oxydans* DSM 2343. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **76**(3), 553-559.
- Gossele, F., Vandenmooter, M., Verdonck, L., Swings, J., Deley, J. 1981. The nitrogen requirements of *Gluconobacter*, *Acetobacter* and *Frateuria*. *Antonie Van Leeuwenhoek Journal of Microbiology*, **47**(4), 289-296.
- Habe, H., Fukuoka, T., Morita, T., Kitamoto, D., Yakushi, T., Matsushita, K., Sakaki, K. 2010. Disruption of the membrane-bound alcohol dehydrogenase-encoding gene improved glycerol use and dihydroxyacetone productivity in *Gluconobacter oxydans*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **74**(7), 1391-1395.
- Habe, H., Shimada, Y., Fukuoka, T., Kitamoto, D., Itagaki, M., Watanabe, K., Yanagishita, H., Sakaki, K. 2009. Production of glyceric acid by *Gluconobacter* sp NBRC3259 using raw glycerol. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **73**(8), 1799-1805.
- Hekmat, D., Bauer, R., Fricke, J. 2003. Optimization of the microbial synthesis of dihydroxyacetone from glycerol with *Gluconobacter oxydans*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, **26**(2), 109-116.
- Hekmat, D., Bauer, R., Neff, V. 2007. Optimization of the microbial synthesis of dihydroxyacetone in a semi-continuous repeated-fed-batch process by *in situ* immobilization of *Gluconobacter oxydans*. *Process Biochemistry*, **42**(1), 71-76.

- Hinshelwood, C.N. 1946. *The chemical kinetics of the bacterial cell*. Clarendon Press Oxford.
- Hu, Z.-C., Liu, Z.-Q., Zheng, Y.-G., Shen, Y.-C. 2010a. Production of 1,3-dihydroxyacetone from glycerol by *Gluconobacter oxydans* ZJB09112. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **20**(2), 340-345.
- Hu, Z.-C., Zheng, Y.-G. 2011. Enhancement of 1,3-dihydroxyacetone production by a UV-induced mutant of *Gluconobacter oxydans* with DO control strategy. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **165**(5-6), 1152-1160.
- Hu, Z.-C., Zheng, Y.-G., Shen, Y.-C. 2010b. Dissolved-oxygen-stat fed-batch fermentation of 1,3-dihydroxyacetone from glycerol by *Gluconobacter oxydans* ZJB09112. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, **15**(4), 651-656.
- Hu, Z.-C., Zheng, Y.-G., Shen, Y.-C. 2011. Use of glycerol for producing 1,3-dihydroxyacetone by *Gluconobacter oxydans* in an airlift bioreactor. *Bioresource Technology*, **102**(14), 7177-7182.
- Izuo, N., Nabe, K., Yamada, S., Chibata, I. 1980. Studies on aerobic fermentation .7. Production of dihydroxyacetone by continuous cultivation of *Acetobacter suboxydans*. *Journal of Fermentation Technology*, **58**(3), 221-226.
- Li, M.-h., Wu, J., Liu, X., Lin, J.-p., Wei, D.-z., Chen, H. 2010a. Enhanced production of dihydroxyacetone from glycerol by overexpression of glycerol dehydrogenase in an alcohol dehydrogenase-deficient mutant of *Gluconobacter oxydans*. *Bioresource Technology*, **101**(21), 8294-8299.
- Li, M., Wu, J., Lin, J., Wei, D. 2010b. Expression of vitreoscilla hemoglobin enhances cell growth and dihydroxyacetone production in *Gluconobacter oxydans*. *Current Microbiology*, **61**(5), 370-375.
- Lidia, S.-R., Stanislaw, B. 2012. Production of dihydroxyacetone from an aqueous solution of glycerol in the reaction catalyzed by an immobilized cell preparation of acetic acid bacteria *Gluconobacter oxydans* ATCC 621. *European Food Research and Technology*, **235**(6), 1125-1132.

- Liebminger, S., Hofbauer, R., Siebenhofer, M., Nyanhongo, G.S., Guebitz, G.M. 2014. Microbial conversion of crude glycerol to dihydroxyacetone. *Waste and Biomass Valorization*, **5**(5), 781-787.
- Liu, Y.-P., Sun, Y., Tan, C., Li, H., Zheng, X.-J., Jin, K.-Q., Wang, G. 2013. Efficient production of dihydroxyacetone from biodiesel-derived crude glycerol by newly isolated *Gluconobacter frateurii*. *Bioresource Technology*, **142**, 384-389.
- Ma, L., Lu, W., Xia, Z., Wen, J. 2010. Enhancement of dihydroxyacetone production by a mutant of *Gluconobacter oxydans*. *Biochemical Engineering Journal*, **49**(1), 61-67.
- Matsushita, K., Nagatani, Y., Shinagawa, E., Adachi, O., Ameyama, M. 1989. Effect of extracellular pH on the respiratory-chain and energetics of *Gluconobacter suboxydans*. *Agricultural and Biological Chemistry*, **53**(11), 2895-2902.
- Nabe, K., Izuo, N., Yamada, S., Chibata, I. 1979. Conversion of glycerol to dihydroxyacetone by immobilized whole cells of *Acetobacter xylinum*. *Applied and Environmental Microbiology*, **38**(6), 1056-1060.
- Ohrem, H.L., Merck, E. 1996. Inhibitory effects of glycerol on *Gluconobacter oxydans*. *Biotechnology Letters*, **18**(3), 245-250.
- Ohrem, H.L., Voss, H. 1996. Process model of the oxidation of glycerol with *Gluconobacter oxydans*. *Process Biochemistry*, **31**(3), 295-301.
- Olijve, W., Kok, J.J. 1979. Analysis of growth of *Gluconobacter oxydans* in glucose containing media. *Archives of Microbiology*, **121**(3), 283-290.
- Oppenhei, J., Marcus, L. 1970. Correlation of ultrastructure in *Azotobacter vinelandii* with nitrogen source for growth. *Journal of Bacteriology*, **101**(1), 286-&.
- Raska, J., Skopal, F., Komers, K., Machek, J. 2007. Kinetics of glycerol biotransformation to dihydroxyacetone by immobilized *Gluconobacter oxydans* and effect of reaction conditions. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, **72**(9), 1269-1283.

- Sato, S., Morita, N., Kitamoto, D., Yakushi, T., Matsushita, K., Habe, H. 2013. Change in product selectivity during the production of glyceric acid from glycerol by *Gluconobacter* strains in the presence of methanol. *AMB Express*, **3**(1), 20-20.
- Silberbach, M., Maier, B., Zimmermann, M., Buchs, J. 2003. Glucose oxidation by *Gluconobacter oxydans*: Characterization in shaking-flasks, scale-up and optimization of the pH profile. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **62**(1), 92-98.
- Stasiak-Rozanska, L., Blazejak, S., Gientka, I. 2014. Effect of glycerol and dihydroxyacetone concentrations in the culture medium on the growth of acetic acid bacteria *Gluconobacter oxydans* ATCC 621. *European Food Research and Technology*, **239**(3), 453-461.
- Svitel, J., Sturdik, E. 1994. Product yield and by-product formation in glycerol conversion to dihydroxyacetone by *Gluconobacter oxydans*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **78**(5), 351-355.
- Underkofler, L.A., Bantz, A.C., Peterson, W.H. 1943. Growth factors for bacteria XIV growth requirements of *Acetobacter suboxydans*. *Journal of Bacteriology*, **45**(2), 183-190.
- Wang, L.L., Qian, J., Ru, Z.C., Zheng, Y.G., Hu, W. 2006. Determination of dihydroxyacetone and glycerol in fermentation broth by pyrolytic methylation/gas chromatography. *Analytica Chimica Acta*, **557**(1-2), 262-266.
- Wei, S., Song, Q., Wei, D. 2007a. Production of *Gluconobacter oxydans* cells from low-cost culture medium for conversion of glycerol to dihydroxyacetone. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, **37**(2), 113-121.
- Wei, S., Song, Q., Wei, D. 2007b. Repeated use of immobilized *Gluconobacter oxydans* cells for conversion of glycerol to dihydroxyacetone. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, **37**(1), 67-76.
- Wethmar, M., Deckwer, W.D. 1999. Semisynthetic culture medium for growth and dihydroxyacetone production by *Gluconobacter oxydans*. *Biotechnology Techniques*, **13**(4), 283-287.

- White, S.A., Claus, G.W. 1982. Effect of intra-cytoplasmic membrane-development on oxidation of sorbitol and other polyols by *Gluconobacter oxydans*. *Journal of Bacteriology*, **150**(2), 934-943.
- Yamada, S., Nabe, K., Izuo, N., Chibata, I. 1979a. Studies on aerobic fermentation .5. Enzymatic production of dihydroxyacetone by *Acetobacter suboxydans* ATCC-621. *Journal of Fermentation Technology*, **57**(3), 221-226.
- Yamada, S., Nabe, K., Izuo, N., Wada, M., Chibata, I. 1979b. Studies on aerobic fermentation .4. Fermentative production of dihydroxyacetone by *Acetobacter suboxydans* ATCC-621. *Journal of Fermentation Technology*, **57**(3), 215-220.
- Zhang, J., Greasham, R. 1999. Chemically defined media for commercial fermentations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **51**(4), 407-421.

CAPÍTULO 4.

ESTUDIO DE LAS CONDICIONES DE OPERACIÓN

CAPÍTULO 4.

ESTUDIO DE LAS CONDICIONES DE OPERACIÓN

Índice

4.1	INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA	181
4.1.1	Resultados experimentales	182
4.1.2	Discusión de los resultados	186
4.2	INFLUENCIA DEL pH.....	191
4.2.1	Resultados experimentales	193
4.2.2	Discusión de los resultados	195
4.3	INFLUENCIA DE LA AGITACIÓN Y EL PORCENTAJE DE INÓCULO	199
4.3.1	Resultados experimentales	200
4.3.2	Discusión de los resultados	207
4.4	BIBLIOGRAFÍA CITADA.....	214

CAPÍTULO 4.

ESTUDIO DE LAS CONDICIONES DE OPERACIÓN

En el Capítulo anterior se identificaron los puntos débiles del proceso de producción de DHA con *G. oxydans*: la parada de la producción de DHA debido al descenso del pH por debajo de un valor crítico, la presencia del fenómeno de inhibición por producto y el papel fundamental que juega el tiempo de exposición a la DHA, además de la existencia de un factor limitante, todavía sin identificar, que impide aumentar la velocidad de producción de DHA a pesar de que haya un mayor número de células productoras en el medio. Para profundizar en la comprensión de este proceso, en este Capítulo se va a abordar el estudio de las condiciones de operación que se han considerado más relevantes: temperatura, pH, agitación y porcentaje de inóculo, con el objetivo de identificar cuál es el factor limitante y conocer su efecto sobre la velocidad de producción para poder maximizarla y evitar un contacto prolongado entre las células y la DHA, minimizando con ello el fenómeno de inhibición por producto.

4.1 INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA

La temperatura es un factor importante ya que influye directamente en la estructura de los componentes celulares, especialmente de lípidos y proteínas, y en las constantes de velocidad de reacción, lo que a su vez depende de las energías de activación, afectando significativamente tanto a la velocidad de crecimiento celular, como a la velocidad de las reacciones enzimáticas que se dan en la célula (Riet y Tramper, 1991), entre otras, la producción de DHA. Generalmente, la actividad catalítica de las enzimas se incrementa con la temperatura hasta alcanzar un máximo, a partir del cual, la velocidad de la reacción decrece rápidamente a consecuencia del proceso de desnaturalización de las proteínas, usualmente denominado desactivación enzimática.

Otro aspecto relevante en el que influye la temperatura es en la cantidad de aire disuelto en el medio, que es una consideración a tener en cuenta, dado que el proceso es aerobio y habitualmente se emplea aire para suministrar oxígeno al cultivo. En este caso, el aumento de la temperatura provoca una disminución de la solubilidad del aire en agua. Por ejemplo, a una temperatura de 10 °C, bajo presión atmosférica, la solubilidad es de 11,5 ppm, mientras que a 30 °C cae hasta 8 ppm (Najafpour, 2007). No

obstante, este efecto puede ser fácilmente contrarrestado con un aumento de la agitación y/o del caudal de aire alimentado.

El microorganismo empleado en la presente Tesis Doctoral es mesófilo y por tanto, puede operar en un intervalo de temperaturas entre 25 y 37 °C, aproximadamente. Por ello, teniendo en cuenta la importancia de esta variable, en este Apartado se han planteado una serie de experimentos a diferentes temperaturas dentro del intervalo mencionado anteriormente, con el objetivo de hallar el valor óptimo de esta variable en el proceso de producción de DHA. Dichos experimentos se han realizado en matraz *Erlenmeyer* a la temperatura correspondiente, con un pH inicial de 5,9, una agitación de 200 rpm, con el medio seleccionado en el Capítulo 3 (sin adición de extracto de levadura, ni peptona) y 25 g/L de concentración inicial de glicerol, para evitar efectos inhibitorios indeseados como, por ejemplo, la inhibición de la producción por el descenso del pH o por una concentración de DHA elevada en el medio. El código de cada experimento se puede consultar en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. *Planificación experimental para el estudio de temperaturas.*

Experimento	Temperatura (°C)
T25	25
T28	28
T30	30
T32	32
T35	35
T37	37

4.1.1 Resultados experimentales

En este Apartado se muestran los resultados de los experimentos planteados en la Tabla 4.1 para el estudio de la temperatura. En las Tablas 4.2 a 4.7 se puede apreciar la evolución con el tiempo de la concentración de glicerol, DHA, ácido glicérico y biomasa, así como de los valores de pH, en cada uno de dichos experimentos.

Tabla 4.2. Resultados del experimento T25 (25 °C). Condiciones: 25 g/L de glicerol, 200 rpm, pH libre, 20 % v/v inóculo.

Tiempo (h)	Biomasa (g/L)	pH	Glicerol (g/L)	DHA producida (g/L)	Ácido glicérico producido (g/L)
0	0,11	5,58	24,35	0,00	0,000
2	0,14	5,40	23,17	1,29	0,001
4	0,14	5,30	20,68	2,54	0,005
6	0,14	5,20	19,29	3,80	0,013
8	0,14	5,15	17,51	5,65	0,021
10	0,15	5,13	16,70	6,61	0,030
19	0,15	4,82	12,21	11,59	0,063
24	0,17	4,66	9,68	14,51	0,096
26	0,16	4,65	7,68	15,88	0,112
28	0,16	4,61	6,51	16,56	0,108
30	0,17	4,56	5,29	18,48	0,123
32	0,18	4,41	3,84	20,13	0,132
52	0,18	4,30	0,12	22,84	0,179

Tabla 4.3. Resultados del experimento T28 (28 °C). Condiciones: 25 g/L de glicerol, 200 rpm, pH libre, 20 % v/v inóculo.

Tiempo (h)	Biomasa (g/L)	pH	Glicerol (g/L)	DHA producida (g/L)	Ácido glicérico producido (g/L)
0	0,11	5,75	24,99	0,00	0,00
2	0,15	5,41	22,21	2,32	0,01
4	0,15	5,10	19,56	3,33	0,02
6	0,16	4,98	17,20	5,75	0,04
8	0,15	4,93	15,64	7,31	0,06
10	0,16	4,83	14,53	8,89	0,06
19	0,16	4,70	7,45	16,15	0,09
24	0,16	4,65	3,94	20,32	0,12
26	0,16	4,45	2,72	22,33	0,13
28	0,17	4,42	1,82	23,36	0,14
30	0,16	4,36	1,25	23,40	0,14
32	0,16	4,39	0,84	23,33	0,15
53	0,17	4,36	0,10	23,59	0,17

Tabla 4.4. Resultados del experimento T30 (30 °C). Condiciones: 25 g/L de glicerol, 200 rpm, pH libre, 20 % v/v inóculo.

Tiempo (h)	Biomasa (g/L)	pH	Glicerol (g/L)	DHA producida (g/L)	Ácido glicérico producido (g/L)
0	0,11	5,87	24,68	0,00	0,00
2	0,16	5,53	22,84	1,49	0,01
4	0,16	5,24	21,08	3,27	0,02
6	0,16	5,04	18,28	5,51	0,03
8	0,16	4,89	15,21	7,75	0,04
10	0,16	4,77	12,72	10,09	0,05
19	0,17	4,58	5,69	17,29	0,09
24	0,16	4,45	1,76	21,26	0,14
26	0,17	4,42	1,43	21,29	0,14
28	0,17	4,44	1,06	21,88	0,15
30	0,18	4,39	0,78	21,30	0,15
32	0,18	4,39	0,56	22,55	0,17
48	0,19	4,32	0,40	23,21	0,19
50	0,18	4,36	0,37	23,42	0,18
52	0,19	4,37	0,21	23,39	0,19

Tabla 4.5. Resultados del experimento T32 (32 °C). Condiciones: 25 g/L de glicerol, 200 rpm, pH libre, 20 % v/v inóculo.

Tiempo (h)	Biomasa (g/L)	pH	Glicerol (g/L)	DHA producida (g/L)	Ácido glicérico producido (g/L)
0	0,11	5,70	24,48	0,00	0,00
2	0,16	5,30	22,18	2,07	0,02
4	0,15	5,09	19,60	3,89	0,04
6	0,15	4,95	18,59	5,42	0,05
8	0,15	4,87	15,31	8,43	0,07
10	0,15	4,79	13,46	10,09	0,08
19	0,15	4,53	7,35	17,10	0,11
24	0,15	4,44	2,43	21,01	0,14
26	0,15	4,41	1,90	22,93	0,16
28	0,15	4,39	1,08	21,41	0,14
30	0,16	4,16	1,00	21,98	0,15
32	0,15	4,36	0,82	22,81	0,15
49	0,16	4,31	0,11	22,86	0,18
51	0,17	4,29	0,11	23,11	0,20
53	0,17	4,27	0,07	23,06	0,20

Tabla 4.6. Resultados del experimento T35 (35 °C). Condiciones: 25 g/L de glicerol, 200 rpm, pH libre, 20 % v/v inóculo.

Tiempo (h)	Biomasa (g/L)	pH	Glicerol (g/L)	DHA producida (g/L)	Ácido glicérico producido (g/L)
0	0,12	5,89	24,71	0,00	0,00
2	0,17	5,40	22,62	1,84	0,02
4	0,15	5,16	19,90	4,38	0,04
6	0,14	4,98	16,97	7,31	0,05
8	0,15	4,87	14,31	9,83	0,06
9,5	0,14	4,82	12,93	11,10	0,07
19	0,14	4,60	6,74	17,48	0,09
24	0,13	4,46	2,80	21,17	0,13
26	0,13	4,45	1,94	22,74	0,14
28	0,14	4,44	1,47	22,39	0,13
30	0,13	4,41	0,86	22,91	0,14
32	0,13	4,39	0,96	23,28	0,15
49	0,14	4,34	0,38	23,17	0,18

Tabla 4.7. Resultados del experimento T35 (35 °C). Condiciones: 25 g/L de glicerol, 200 rpm, pH libre, 20 % v/v inóculo.

Tiempo (h)	Biomasa (g/L)	pH	Glicerol (g/L)	DHA producida (g/L)	Ácido glicérico producido (g/L)
0	0,12	5,87	24,54	0,00	0,00
2	0,16	5,34	22,53	1,78	0,02
4	0,15	5,13	19,69	3,46	0,03
6	0,14	4,99	17,27	5,90	0,05
8	0,13	4,87	14,68	8,03	0,06
9,5	0,13	4,82	13,65	9,14	0,06
19	0,13	4,59	9,32	16,15	0,09
24	0,13	4,48	4,87	19,53	0,13
26	0,12	4,43	4,08	20,22	0,13
28	0,13	4,42	3,28	20,94	0,15
30	0,14	4,38	2,84	21,24	0,15
32	0,13	4,39	2,17	21,28	0,15
49	0,14	4,30	1,01	22,92	0,18

4.1.2 Discusión de los resultados

En la Figura 4.1 se muestra la evolución de la concentración de glicerol, DHA, ácido glicérico y biomasa, así como la evolución del pH con el tiempo para los experimentos realizados a distintas temperaturas. Atendiendo a la evolución de la concentración de glicerol (Figura 4.1 (a)), se observa que a 25 °C el consumo de sustrato transcurre visiblemente más lento que a temperaturas más elevadas. Las diferencias no son tan claras en el intervalo de temperaturas de 28 a 37 °C, aunque a esta última temperatura parece ralentizarse el proceso, en especial en el tramo final. La evolución de la concentración de DHA producida con el tiempo muestra un comportamiento análogo al anterior (Figura 4.1 (b)): la velocidad de producción de DHA es claramente más lenta a 25 °C y sutilmente inferior a 37 °C en comparación con el resto de temperaturas.

En cuanto a la producción de ácido glicérico, expuesta en la Figura 4.1 (c), cabe mencionar que la concentración final alcanzada en todos los casos es muy similar y las diferencias en la evolución de su concentración con el tiempo son muy ligeras, excepto para el experimento T25, en el que se observa una menor velocidad de formación. La evolución del ácido glicérico está íntimamente relacionada con la caída del pH. Por ello, en la Figura 4.1 (d) se muestra una caída idéntica del pH en todos los experimentos, con excepción del experimento realizado a 25 °C, en el que la caída es más suave. En ningún caso el valor de pH baja de 4, ni la concentración de DHA sube de 25 g/L (dado que se ha partido de una concentración de glicerol de 25 g/L). Por lo tanto, no se está produciendo ningún fenómeno inhibitorio que interfiera en los resultados.

Finalmente, no se encuentran diferencias significativas en el crecimiento de la biomasa a pesar de que la temperatura se haya incrementado en 12 °C (Figura 4.1 (e)). Este comportamiento no es el habitual; normalmente, al incrementarse la temperatura en unos 10 °C la velocidad de crecimiento de la bacteria puede llegar a doblarse o incluso triplicarse, hasta alcanzar un máximo, a partir del cual, el aumento de la temperatura provoca la muerte celular debido a la desnaturalización y coagulación de las proteínas (Hinshelwood, 1946). No obstante, la limitación de los nutrientes en los experimentos realizados interfiere de manera más pronunciada en el crecimiento que el incremento de temperatura, por lo que no se aprecian diferencias significativas. Sin embargo, la limitación del crecimiento no afecta a la producción de DHA, ya que ambos procesos están desacoplados (Bories y col., 1991).

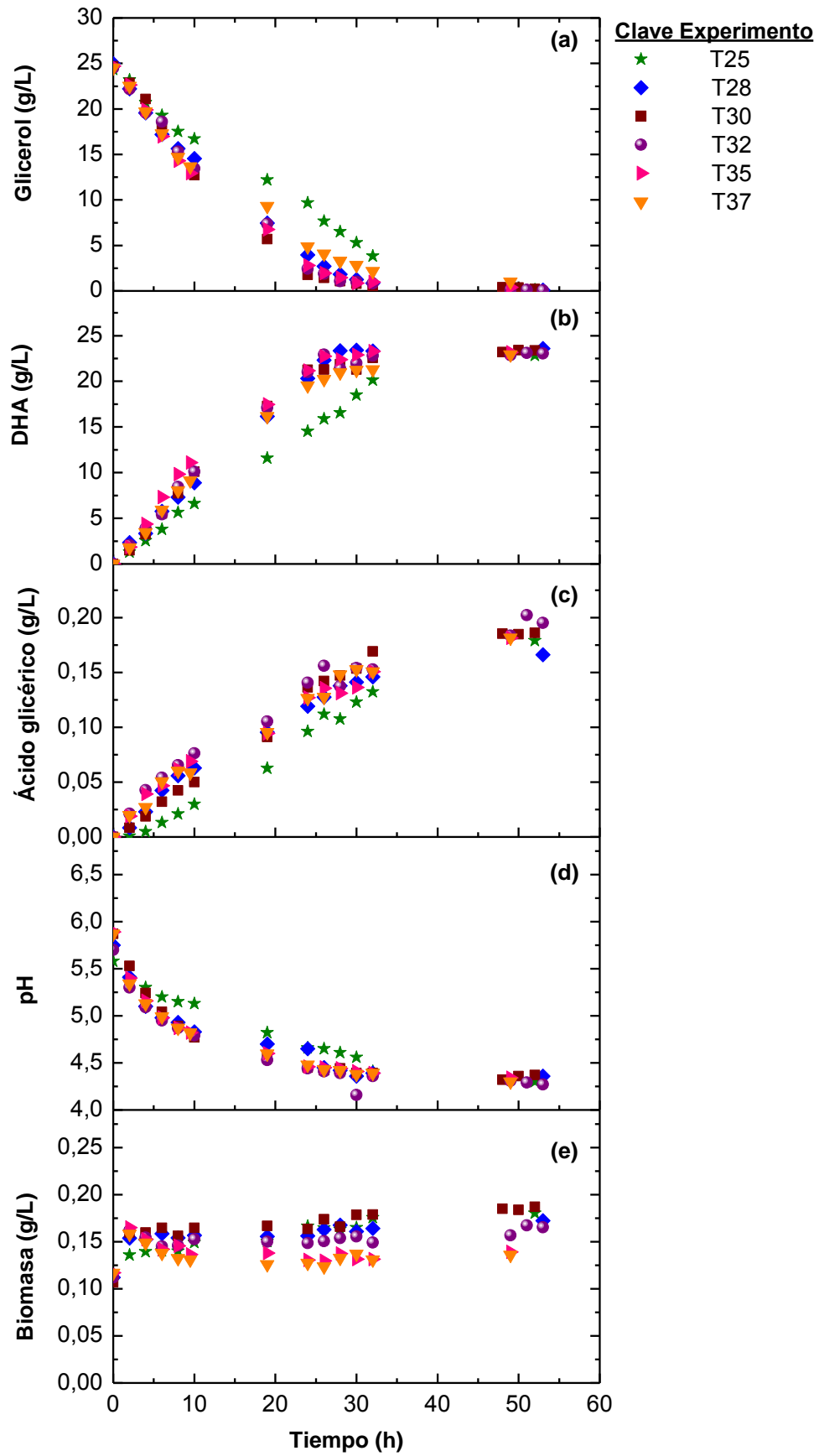


Figura 4.1. Evolución con el tiempo del glicerol (a); la DHA (b); el ácido glicérico (c); el pH (d) y la biomasa (e) para los experimentos T25, T28, T30, T32, T35 y T37.

Una vez realizado el análisis cualitativo de la influencia de la temperatura en el consumo de glicerol y en la producción de los distintos compuestos, se va a realizar una evaluación cuantitativa centrada exclusivamente en la producción de DHA, que es el principal objetivo de este trabajo. Para ello, se ha calculado el rendimiento a producto ($Y_{P/S}$), la productividad volumétrica (P_V) y la productividad específica (P_S), mediante las ecuaciones [3.3], [3.4] y [3.5], respectivamente. Así, se ha elaborado la Figura 4.2 representando los valores anteriores en función de la temperatura para ver la influencia de esta variable sobre los mismos.

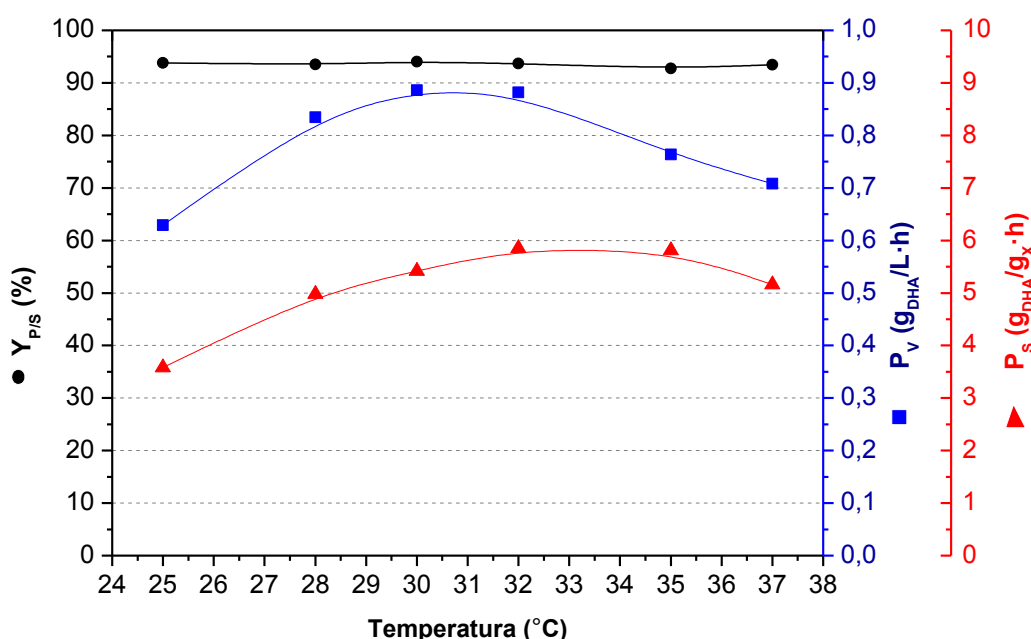


Figura 4.2. Rendimiento a DHA; $Y_{P/S}$ (círculos negros), productividad volumétrica; P_V (cuadrados azules) y productividad específica; P_S (triángulos rojos) en función de la temperatura.

Según muestra la figura anterior, el rendimiento ronda el 95 % en todos los casos, por lo que la temperatura no parece ejercer ninguna influencia sobre este parámetro. Sin embargo, la productividad volumétrica alcanza un máximo en el intervalo de temperaturas de 30-32 °C, mientras que el intervalo en el cual la productividad específica es máxima, es más amplio: 32-35 °C, aunque las diferencias no son muy grandes entre 30 y 37 °C.

Para poder discernir cuál es la temperatura óptima para llevar a cabo este proceso, se ha calculado la actividad enzimática (a_0), entendida como la velocidad inicial de producción de DHA y calculada mediante regresión lineal. Los ajustes efectuados se muestran en la Figura 4.3, mientras que los valores de actividad enzimática obtenidos se reflejan en la Tabla 4.8.

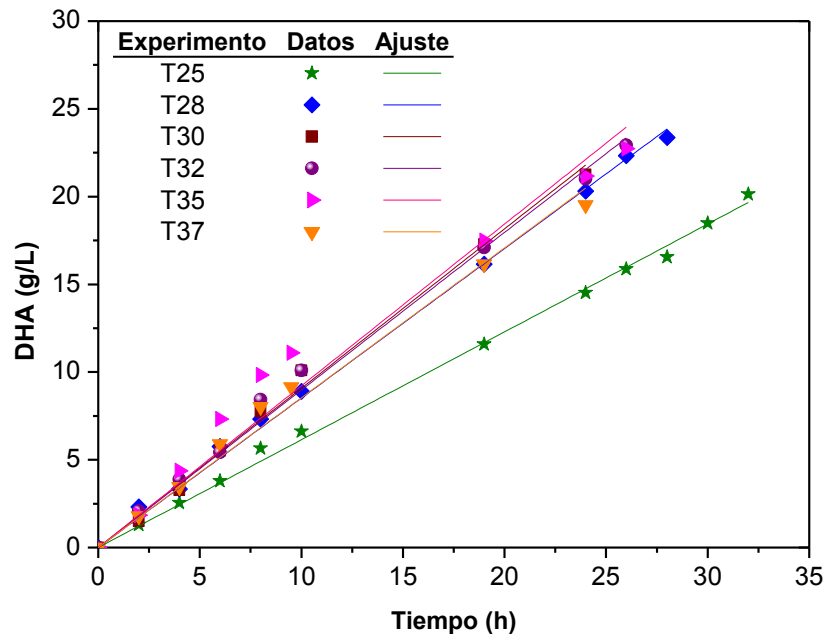


Figura 4.3. Representación de los ajustes lineales de los datos de concentración de DHA frente al tiempo de los experimentos realizados a diferentes temperaturas para el cálculo de la actividad enzimática.

Tabla 4.8. Valores de actividad enzimática (a_0) de los experimentos realizados a distinta temperatura.

Experimento	a_0 (g _{DHA} /L·h)	r^2
T25	0,61	0,999
T28	0,85	0,999
T30	0,91	0,998
T32	0,90	0,997
T35	0,92	0,987
T37	0,85	0,995

En la Figura 4.4 se ha representado la actividad enzimática frente a la temperatura para ver la relación entre ambas. En dicha figura se aprecia un aumento sustancial de la actividad enzimática al incrementarse la temperatura de 25 °C a 30 °C, valor a partir del cual se alcanza la actividad máxima, que permanece constante hasta 35 °C. A partir de esta temperatura se produce un claro descenso en la actividad enzimática. Por lo tanto, la temperatura óptima para llevar a cabo el proceso puede establecerse en 30 °C, por ser el valor mínimo de temperatura para el cual la actividad enzimática es máxima. A esta misma conclusión se llegó en sendos estudios publicados por Yamada y col. (1979) y Wei y col. (2007); estos autores argumentaron que a pesar de observar el máximo de actividad enzimática a 35 °C, la estabilidad térmica se ve gradualmente mermada a esta temperatura y, por ello, la temperatura más apropiada para la producción de DHA es de 30 °C. Por consiguiente, los estudios posteriores del presente Capítulo se realizarán a una temperatura de 30 °C.

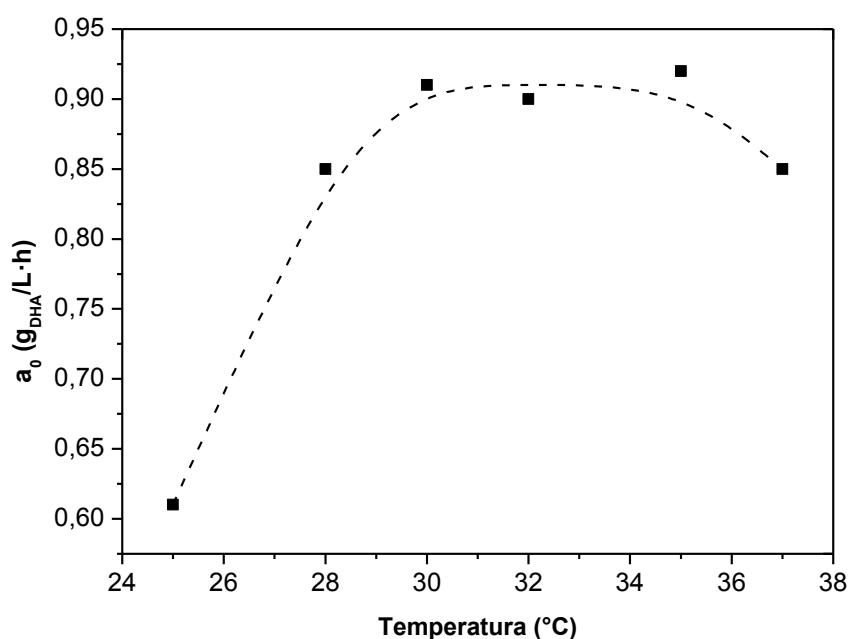


Figura 4.4. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de *G. oxydans* (a_0) en matraz Erlenmeyer a 200 rpm, con un 20 % v/v de inóculo y un pH_0 de 5,9.

4.2 INFLUENCIA DEL pH

El pH juega un papel esencial en el metabolismo bacteriano, tal y como se ha puesto de manifiesto con anterioridad. En el Capítulo 3 de esta Memoria, se han estudiado transversalmente ciertos aspectos relacionados con el pH. Así, se ha comprobado la existencia de un valor crítico, en torno a 3,7, que impide que se alcance la conversión completa en el proceso debido a la inhibición total de la ruta de las pentosas fosfato y a la afectación simultánea de la cadena respiratoria (Olijve y Kok, 1979; Svitel y Sturdik, 1994). También se ha establecido el efecto de aumentar el pH inicial del medio, que favorece tanto la producción de biomasa, al aumentar la eficiencia en el proceso de síntesis de ATP (Matsushita y col., 1989), como la producción de ácido glicérico. Sin embargo, no se ha estudiado específicamente ninguna estrategia de pH para optimizar la producción de DHA. De hecho, en el Apartado 3.2.2, relativo al estudio de la composición del medio, no todos los experimentos comenzaban exactamente en el mismo pH (Figura 3.1 (d)), por lo que conviene descartar que una estrategia de pH errónea sea la causante de la limitación observada en la velocidad de producción de DHA al aumentar la cantidad de biomasa.

Según la literatura consultada, las enzimas del ciclo de las pentosas, responsables del crecimiento celular, operan mejor a un pH de 7. Por el contrario, una disminución del pH se traduce en un aumento de la velocidad de consumo de oxígeno y, por tanto, de producción de DHA (Ohrem y Voss, 1995). Este incremento de la velocidad de producción puede ser consecuencia del cambio en la composición de la cadena respiratoria; de hecho, Matsushita y col. (1989) observaron un aumento del contenido en citocromo c (proteína transmembrana que forma parte de la cadena de transporte de electrones) con un aumento concomitante de la actividad enzimática al disminuir el pH. Tras estudiar el efecto del pH en la producción de DHA, Svitel y Sturdik (1994) hallaron un máximo en la velocidad de consumo de oxígeno a pH 5 y Hu y col. (2010a) descubrieron que el valor de pH anterior conduce a que la concentración de DHA en el caldo sea máxima. Por lo tanto, un pH de 5 parece apropiado para llevar a cabo el proceso. No obstante, Hu y col. (2010b) plantearon una estrategia de pH en escalón, de modo que durante las primeras horas fijaron su valor en 6 para favorecer el crecimiento de la biomasa y, a continuación, en 5, para favorecer la producción de DHA. Con esta estrategia mejoraron la producción de DHA casi en un 10 % en comparación con la estrategia de pH constante.

Con toda la información anterior, se ha planteado una estrategia de pH, que se nombra como 7-libre-5, consistente en comenzar el proceso a un pH inicial de 7 para aumentar la actividad de las enzimas del ciclo de las pentosas, y así obtener biomasa suficiente en el experimento sin limitaciones nutricionales; y, a continuación, dejar evolucionar libremente el pH para aumentar la producción de citocromo c, hasta alcanzar un pH de 5, que se mantendrá constante hasta el final del experimento para favorecer la producción de DHA. El experimento en el que se ha aplicado esta estrategia de control de pH se puede comparar con aquél en el que el pH se ha dejado evolucionar libremente, para comprobar si una estrategia de pH inapropiada constituye un factor limitante en el proceso. Asimismo, para descartar que en el estudio de la composición del medio de cultivo estuviera influyendo la diferente evolución del pH que se producía en función del contenido en fuente compleja, se ha realizado un experimento adicional con un medio sin limitaciones nutricionales, aquél que contiene 5 g/L de extracto de levadura, para cotejar los resultados con el experimento sin extracto de levadura, ambos bajo la misma estrategia de pH.

Dado que en matraz *Erlenmeyer* no se puede efectuar un control estricto del pH, los experimentos realizados para estudiar la estrategia de pH citada anteriormente se han desarrollado en un biorreactor de tipo tanque agitado de 2 L, con una aireación de 1 vvm y una agitación de 360 rpm. Las condiciones fluidodinámicas se han seleccionado de modo que el coeficiente de transporte de oxígeno (k_La) en el biorreactor se asemeje al que se obtiene en matraz *Erlenmeyer* a 200 rpm, que es como se han realizado los experimentos a pH libre. Para ello, se ha calculado el coeficiente de transporte de oxígeno en matraz *Erlenmeyer* mediante la ecuación empírica [4.1], propuesta por Liu y col. (2006) y adaptada a fluidos no newtonianos por García-Ochoa y col. (2013):

$$k_La \left(s^{-1} \right) = 1,44 \cdot 10^{-3} \cdot N^{0,88} \cdot \left(\frac{V_F}{V_L} \right)^{0,80} \cdot \left(\frac{\mu_L}{\mu_W} \right)^{-0,4} \quad [4.1]$$

donde: N es la agitación en s^{-1} ; V_F es el volumen del matraz *Erlenmeyer*; V_L es el volumen de líquido; μ_L es la viscosidad del caldo y μ_W es la viscosidad del agua.

A continuación, se ha aplicado el método predictivo descrito en el Apartado 2.5.1 para la estimación del coeficiente de transporte de oxígeno en biorreactor en función de los parámetros geométricos del recipiente, las propiedades físicas del líquido

y las condiciones de operación (García-Ochoa y Gómez, 2004), de manera que mediante un procedimiento iterativo se han podido determinar las condiciones de aireación y agitación que dan como resultado un k_{La} similar al de matraz *Erlenmeyer*, cuyo valor es de $0,0135\text{ s}^{-1}$.

En la Tabla 4.9, expuesta a continuación, se muestra el código y las condiciones de cada experimento planteado para el estudio de la estrategia de pH.

Tabla 4.9. Planificación experimental para el estudio de la estrategia de pH.

Experimento	Evolución de pH	Extracto de levadura (g/L)	Escala	Objetivo
0YE-pHlibre	Libre	0	Matraz Erlenmeyer	Comparar estrategia de pH
0YE-pHcont	7-libre-5	0	Biorreactor 2L	Comparar composición del medio bajo el mismo pH
5YE-pHcont	7-libre-5	5	Biorreactor 2L	

4.2.1 Resultados experimentales

En las Tablas 4.10 a 4.12 se recogen los principales resultados experimentales del estudio de producción de DHA bajo distintas estrategias de pH, tanto para la evolución libre de pH, como para pH controlado, incluyendo un experimento con fuente compleja (sin limitaciones nutricionales).

Tabla 4.10. Resultados del experimento 0YE-pHlibre. Condiciones: 25 g/L de glicerol, 0 g/L de extracto de levadura, 200 rpm, pH libre, 20 % v/v inóculo.

Tiempo (h)	Biomasa (g/L)	pH	Glicerol (g/L)	DHA producida (g/L)	Ácido glicérico producido (g/L)
0	0,11	5,96	27,34	0,00	0,00
2	0,16	5,58	25,05	1,80	0,02
5	0,15	5,19	20,74	4,53	0,03
8	0,15	4,98	16,27	7,61	0,05
10	0,14	4,89	14,64	9,44	0,07
24,5	0,16	4,45	2,88	20,70	0,16
26	0,16	4,41	1,95	22,02	0,18
28	0,16	4,4	1,50	22,10	0,18
30	0,16	4,37	1,11	22,71	0,19
32	0,16	4,37	0,85	22,77	0,19
51	0,17	4,37	0,32	23,47	0,21
54	0,17	4,35	0,32	23,53	0,22

Tabla 4.11. Resultados del experimento 0YE-pHcont. Condiciones: 25 g/L de glicerol, 0 g/L de extracto de levadura, 360 rpm, 1vvm, estrategia de pH 7-libre-5, 20 % v/v inóculo.

Tiempo (h)	Biomasa (g/L)	pH	Glicerol (g/L)	DHA producida (g/L)	Ácido glicérico producido (g/L)
0	0,10	7,01	26,35	0,00	0,00
2	0,15	6,23	24,46	1,58	0,06
4,5	0,19	5,53	22,65	3,64	0,10
6	0,19	5,33	21,22	5,22	0,11
7	0,19	5,23	20,10	6,39	0,13
17	0,17	5,15	10,68	15,66	0,14
20,5	0,17	5,16	7,72	18,14	0,14
22	0,17	5,15	6,51	19,32	0,15
26	0,16	5,15	3,74	22,54	0,15
40,9	0,19	5,15	0,63	25,83	0,15

Tabla 4.12. Resultados del experimento 5YE-pHcont. Condiciones: 25 g/L de glicerol, 5 g/L de extracto de levadura, 360 rpm, 1vvm, estrategia de pH 7-libre-5, 20 % v/v inóculo.

Tiempo (h)	Biomasa (g/L)	pH	Glicerol (g/L)	DHA producida (g/L)	Ácido glicérico producido (g/L)
0	0,17	6,98	27,5	0,0	0,00
2	0,26	6,72	25,0	1,5	0,01
4	0,41	6,46	22,5	3,0	0,06
6	0,68	5,96	20,0	5,1	0,10
7,8	0,89	5,32	17,7	6,9	0,14
17	1,00	5,16	6,3	18,1	0,51
19	0,99	5,16	3,8	20,5	0,54
21	0,97	5,16	1,3	23,3	0,56
25	0,98	5,16	0,5	25,9	0,59
26,8	0,98	5,16	0,4	26,1	0,61
46	1,02	5,16	0,1	26,2	0,63

4.2.2 Discusión de los resultados

Los datos de las Tablas 4.10 y 4.11, correspondientes a los experimentos sin extracto de levadura y pH libre y controlado, respectivamente, se han representado en la Figura 4.5 para poder observar gráficamente el efecto del pH en la evolución del proceso.

En primer lugar, cabe destacar que la evolución de la concentración de glicerol mostrada en la Figura 4.5 (a) es idéntica en ambos experimentos, a pesar de que en un experimento el pH inicial comienza en 7 y en el otro, en 6. Lo mismo ocurre con la evolución de la concentración de DHA, expuesta en la Figura 4.5 (b). Estas observaciones demuestran que la producción de DHA es independiente de la estrategia de pH empleada y que, por tanto, el pH no es un factor limitante en el proceso, siempre y cuando no sea inferior a 4, tal y como se demostró en el Apartado 3.3.2 del Capítulo 3. Además, estos resultados están en consonancia con los que se obtuvieron en los experimentos con glicerol crudo a diferentes pH iniciales, en los que tampoco se observaron diferencias ni en el consumo de glicerol, ni en la producción de DHA, incluso con una diferencia en el pH inicial de 2 puntos (ver Figura 3.19).

En cuanto al crecimiento de la biomasa, tampoco se observan diferencias significativas en la Figura 4.5 (e), seguramente debido a la limitación de nutrientes del medio de cultivo. Sin embargo, donde se hallan diferencias es en la producción de ácido glicérico mostrada en la Figura 4.5 (c). En el tramo de producción correspondiente a las diez primeras horas, en el cual se ha dejado evolucionar el pH libremente, la producción de subproducto es mayor en el experimento *OYE-pHcont* cuyo pH inicial es una unidad mayor. Esta misma apreciación también se hizo en el estudio con glicerol crudo a distintos pH iniciales, donde un pH inicial superior conducía a una mayor producción de ácido glicérico (Figura 3.19 (c)). No obstante, en la zona de pH constante e igual a 5 del experimento *OYE-pHcont*, la producción de ácido glicérico se detiene, mientras que en el experimento *OYE-pHlibre* dicha producción continúa, aunque la cantidad total de subproducto producida sigue siendo irrisoria (0,22 g/L). Por lo tanto, parece razonable escoger un pH inicial más bajo para minimizar la producción de ácido glicérico y después mantenerlo en torno a 5.

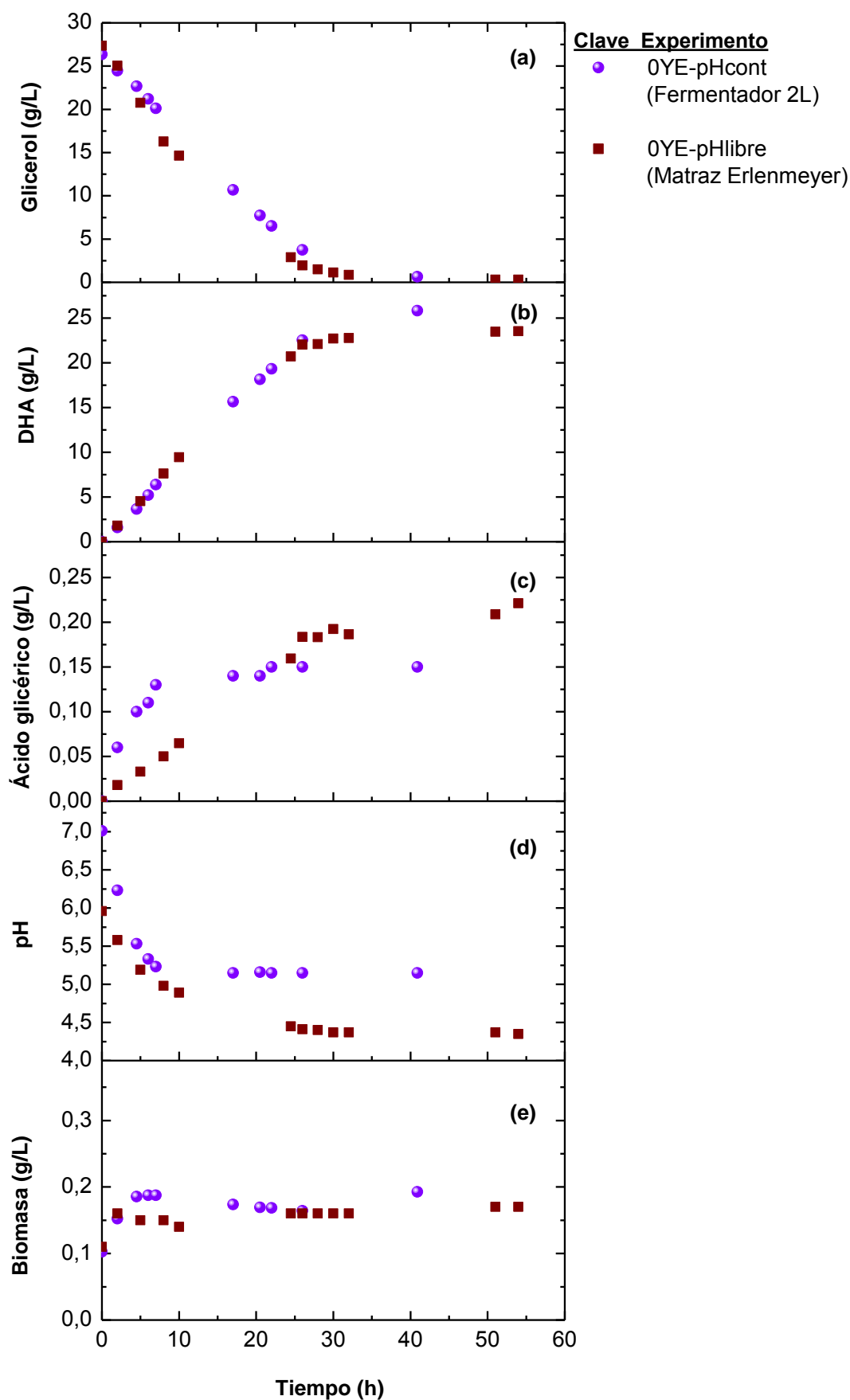


Figura 4.5. Evolución con el tiempo del glicerol (a); la DHA (b); el ácido glicérico (c); el pH (d) y la biomasa (e) para los experimentos 0YE-pHcont y 0YE-pHlibre.

Por otro lado, aunque en la Figura 4.5 se puede apreciar que la producción de DHA no está influenciada por la estrategia de pH, se ha considerado interesante la repetición de dos de los experimentos del estudio del medio de cultivo del Apartado 3.2 (0YE y 5YE), pero bajo control de pH, para descartar definitivamente que la diferencia en el pH inicial de dichos experimentos (Figura 3.1 (d)), fuera la causante de la relación no proporcional entre la cantidad de biomasa y la velocidad de producción de DHA.

En la Figura 4.6 se exponen los resultados de los experimentos con distinta cantidad de fuente compleja, pero llevados a cabo bajo la misma estrategia de pH en biorreactor: 0YE-pHcont y 5YE-pHcont, sin fuente compleja adicional y con 5 g/L de extracto de levadura, respectivamente. El comportamiento es idéntico al observado en la Figura 3.1 (experimentos 0YE y 5YE sin control de pH). Durante las 10 primeras horas, tanto el consumo de glicerol, como la producción de DHA son análogos en ambos experimentos, tal y como se muestra en las Figuras 4.6 (a) y (b). A partir de las 10 horas de biotransformación, la velocidad de producción de DHA en el experimento 5YE-pHcont se incrementa ligeramente, coincidiendo con el final de la etapa de crecimiento exponencial (Figura 4.6 (e)), posiblemente debido a la formación de las membranas intracitoplasmáticas como ya se discutió en el Apartado 3.2.2. Sin embargo, a pesar de que en el experimento 5YE-pHcont hay 5 veces más células productoras que en el experimento 0YE-pHcont, la velocidad de producción de DHA no se ve incrementada en la misma medida. Por lo tanto, el pH no es el factor que limita la velocidad de producción de DHA observada a altas concentraciones de biomasa.

Por último, a diferencia de lo que ocurre con la producción de DHA, según la Figura 4.6 (c), en el caso de la producción de ácido glicérico parece haber una relación directa entre la cantidad de subproducto generada y la cantidad de biomasa presente en el caldo, como ya se había observado con anterioridad en el Apartado 3.2.2. Por lo que el factor que limita la producción de DHA no afecta al subproducto de la misma manera.

En definitiva, el pH no constituye un factor limitante para la producción de DHA. La limitación observada está provocada por otro factor que se tratará de identificar en los siguientes Apartados.

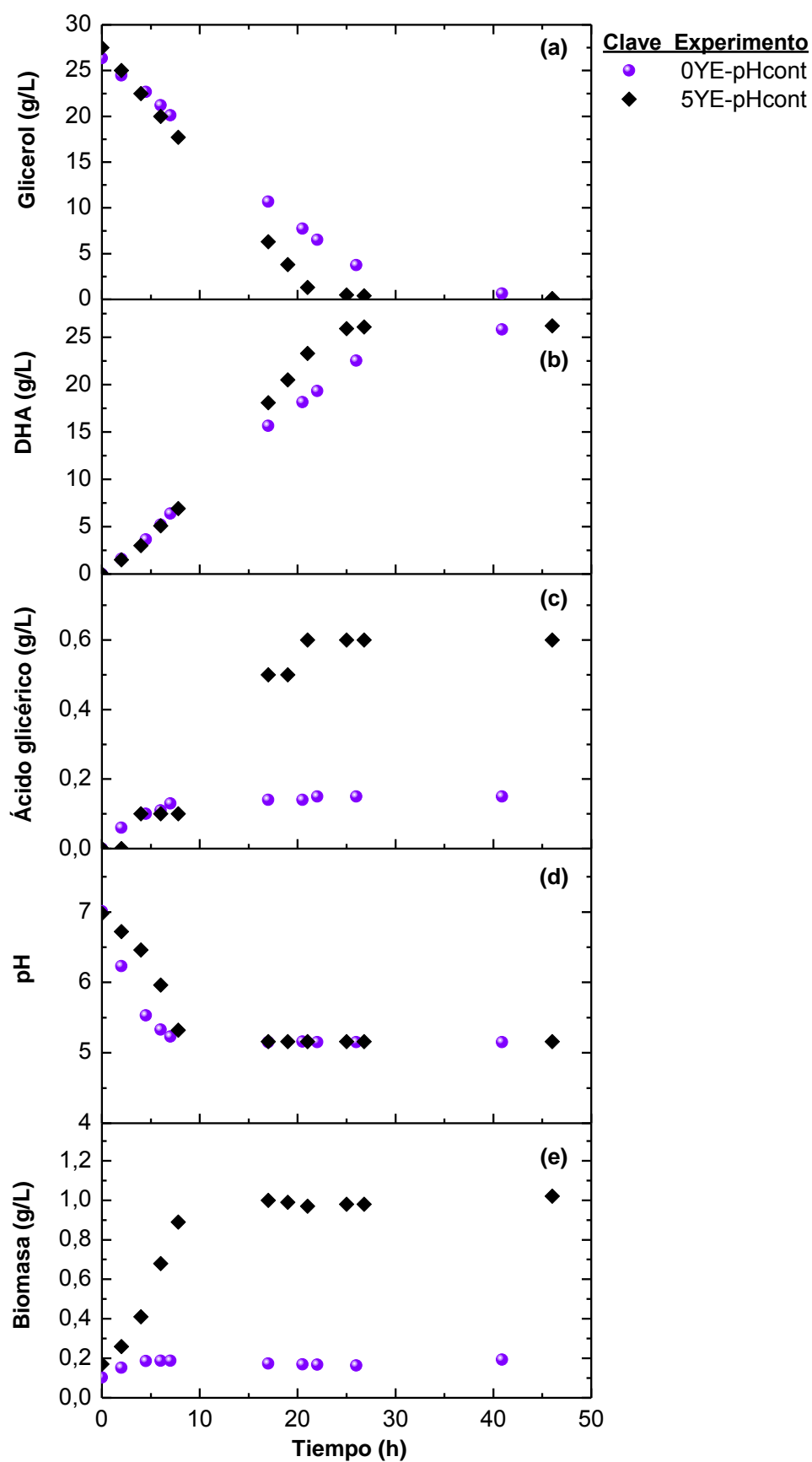


Figura 4.6. Evolución con el tiempo del glicerol (a); la DHA (b); el ácido glicérico (c); el pH (d) y la biomasa (e) para los experimentos 0YE-pHcont y 5YE-pHcont.

4.3 INFLUENCIA DE LA AGITACIÓN Y EL PORCENTAJE DE INÓCULO

La agitación está directamente relacionada con el transporte de oxígeno desde la fase gaseosa a la fase líquida, lo que resulta vital para que haya oxígeno disuelto en el líquido y, por tanto, disponible para su consumo por parte de los microorganismos aerobios. Además, la agitación es fundamental para obtener un sistema de mezcla suficiente para que haya una distribución homogénea de todas sus propiedades, evitando así, que se den gradientes de temperatura y/o concentración. Una mezcla homogénea en el líquido es esencial para que las células puedan acceder a todos los nutrientes, incluyendo el oxígeno disuelto, de manera eficiente. Por ello, la agitación es un factor importante en todos los bioprocesos en general, pero de especial relevancia en los bioprocesos aeróbicos, como es el caso de la producción de DHA con *G. oxydans*.

En los Apartados anteriores se ha confirmado que ni la temperatura, ni el pH son factores limitantes en este proceso. Únicamente faltan por estudiar los otros dos factores que se han considerado relevantes en la producción de DHA: el porcentaje de inóculo y la agitación. El primero de ellos va a influir fundamentalmente en la cantidad final de biomasa, ya que un aumento del volumen de inóculo provoca un aumento tanto de la concentración inicial de biomasa, como de la cantidad de fuente compleja arrastrada en el experimento. Sin embargo, la agitación, debido a su importancia, podría tener mayor repercusión en el proceso. De hecho, por descarte, es muy probable que esta variable esté relacionada con la limitación en la actividad enzimática que se observa en el experimento del Apartado 3.2.3 al aumentar la concentración de biomasa a 200 rpm. Una posible explicación a este fenómeno podría ser que el oxígeno disponible por célula disminuye al aumentar la concentración de biomasa a una agitación fijada y esto influye negativamente en la producción de DHA. Para confirmar esta hipótesis, es necesario estudiar conjuntamente la agitación y la concentración de biomasa. Por lo tanto, se ha planteado un estudio sistemático del porcentaje de inóculo y de la agitación de manera simultánea. Para ello, se han realizado experimentos con un porcentaje de inóculo del 5, 10, 20 y 40 %, a tres agitaciones diferentes: 200, 300 y 400 rpm. Todos estos experimentos se han llevado a cabo en matraz *Erlenmeyer*, a 30°C, pH libre y con una concentración inicial de glicerol de 25 g/L, sin adición al medio de cultivo de fuente compleja, a excepción de la que acompaña al inóculo. En la Tabla 4.13 se puede consultar la planificación experimental y el código de cada experimento.

Tabla 4.13. Planificación experimental para el estudio simultáneo del porcentaje de inóculo y la agitación.

Experimento	Porcentaje de inóculo (% v/v)	C _{x0} (g/L)	Agitación (rpm)
In5%-200	5	0,03	200
In10%-200	10	0,06	
In20%-200	20	0,12	
In40%-200	40	0,24	
In5%-300	5	0,03	300
In10%-300	10	0,06	
In20%-300	20	0,12	
In40%-300	40	0,24	
In5%-400	5	0,03	400
In10%-400	10	0,06	
In20%-400	20	0,12	
In40%-400	40	0,24	

4.3.1 Resultados experimentales

Los resultados de los experimentos especificados en la Tabla 4.13 se recogen en las Tablas 4.14 a 4.25. En dichas tablas se muestra la evolución con el tiempo del pH y de las concentraciones de biomasa, glicerol y DHA para cada experimento en cuestión. Sin embargo, en estos experimentos no fue posible cuantificar el ácido glicérico. No obstante, la caída del pH en los distintos experimentos es consecuencia directa de la producción de dicho subproducto; por lo tanto, la evolución del pH con el tiempo es un reflejo bastante fiel de la producción de ácido glicérico.

Tabla 4.14. Resultados del experimento In5%-200 (5 % v/v inóculo y 200 rpm). Condiciones: 25 g/L de glicerol, 0 g/L de extracto de levadura, 30°C, pH libre.

Tiempo (h)	Biomasa (g/L)	pH	Glicerol (g/L)	DHA producida (g/L)
0	0,03	5,90	28,72	0,00
2	0,04	5,58	28,06	0,35
4	0,06	5,43	27,58	0,98
6	0,06	5,35	26,52	1,81
16	0,06	4,78	22,83	5,23
18	0,06	4,71	21,99	6,16
20	0,06	4,50	21,02	7,51
22	0,06	4,50	20,63	7,35
24	0,06	4,42	20,35	7,70
26	0,07	4,15	20,12	8,12
28	0,06	4,11	19,75	9,57
46	0,08	3,93	17,24	11,96

Tabla 4.15. Resultados del experimento In10%-200 (10 % v/v inóculo y 200 rpm). Condiciones: 25 g/L de glicerol, 0 g/L de extracto de levadura, 30°C, pH libre.

Tiempo (h)	Biomasa (g/L)	pH	Glicerol (g/L)	DHA producida (g/L)
0	0,05	5,76	30,25	0
2	0,09	5,44	29,54	0,69
4	0,12	5,09	28,88	2,06
6	0,12	5,07	26,85	3,64
16	0,12	4,53	18,99	10,86
18	0,16	4,2	15,56	13,62
20	0,12	4,35	16,45	13,21
22	0,14	4,26	15,01	14,49
24	0,17	4,02	11,37	17,32
26	0,14	4,05	13,21	16,32
28	0,19	3,88	9,46	19,33
46	0,16	3,83	6,36	22,64

Tabla 4.16. Resultados del experimento In20%-200 (20 % v/v inóculo y 200 rpm). Condiciones: 25 g/L de glicerol, 0 g/L de extracto de levadura, 30°C, pH libre.

Tiempo (h)	Biomasa (g/L)	pH	Glicerol (g/L)	DHA producida (g/L)
0	0,11	5,96	27,34	0,00
2	0,16	5,58	25,05	1,80
5	0,15	5,19	20,74	4,53
8	0,15	4,98	16,27	7,61
10	0,14	4,89	14,64	9,44
24,5	0,16	4,45	2,88	20,70
26	0,16	4,41	1,95	22,02
28	0,16	4,4	1,50	22,10
30	0,16	4,37	1,11	22,71
32	0,16	4,37	0,85	22,77
51	0,17	4,37	0,32	23,47
54	0,17	4,35	0,32	23,53

Tabla 4.17. Resultados del experimento In40%-200 (40 % v/v inóculo y 200 rpm). Condiciones: 25 g/L de glicerol, 0 g/L de extracto de levadura, 30°C, pH libre.

Tiempo (h)	Biomasa (g/L)	pH	Glicerol (g/L)	DHA producida (g/L)
0	0,21	5,73	37,37	0,00
2	0,34	5,33	35,19	1,99
4	0,47	5,07	32,84	4,19
6	0,48	4,91	31,48	7,11
16	0,53	4,18	18,45	19,04
18	0,55	4,11	15,32	20,69
20	0,51	4,06	12,95	22,70
22	0,55	4,01	8,73	26,13
24	0,56	3,91	7,77	27,00
26	0,56	3,89	6,51	29,09
28	0,54	3,86	3,73	30,25
46	0,58	3,79	1,14	33,59

Tabla 4.18. Resultados del experimento In5%-300 (5 % v/v inóculo y 300 rpm). Condiciones: 25 g/L de glicerol, 0 g/L de extracto de levadura, 30°C, pH libre.

Tiempo (h)	Biomasa (g/L)	pH	Glicerol (g/L)	DHA producida (g/L)
0	0,03	6,30	28,95	0,00
2	0,04	5,55	27,22	0,33
4	0,05	5,39	26,57	0,93
6	0,05	5,17	25,76	1,84
18	0,06	4,83	21,35	6,72
20	0,05	4,78	20,76	7,16
22	0,07	4,46	20,05	7,82
24	0,06	4,39	19,75	8,24
28	0,07	4,19	18,36	9,13
31	0,08	4,09	17,16	9,62

Tabla 4.19. Resultados del experimento In10%-300 (10 % v/v inóculo y 300 rpm). Condiciones: 25 g/L de glicerol, 0 g/L de extracto de levadura, 30°C, pH libre.

Tiempo (h)	Biomasa (g/L)	pH	Glicerol (g/L)	DHA producida (g/L)
0	0,06	5,73	31,62	0,00
2	0,08	5,53	29,11	0,66
4	0,11	5,13	28,57	1,93
6	0,11	5,04	24,44	3,70
18	0,14	4,29	15,28	13,49
20	0,13	4,27	15,70	12,93
22	0,15	4,00	14,54	14,12
24	0,14	4,11	13,38	16,27
28	0,15	3,96	11,09	18,71
31	0,17	3,88	10,40	19,01

Tabla 4.20. Resultados del experimento In20%-300 (20 % v/v inóculo y 300 rpm). Condiciones: 25 g/L de glicerol, 0 g/L de extracto de levadura, 30°C, pH libre.

Tiempo (h)	Biomasa (g/L)	pH	Glicerol (g/L)	DHA producida (g/L)
0	0,11	5,55	29,88	0,00
2	0,15	5,36	28,22	0,85
4	0,21	5,05	25,78	3,82
6	0,23	4,89	22,82	6,94
18	0,25	4,14	7,94	20,68
20	0,24	4,09	6,67	21,27
22	0,27	3,99	4,50	24,58
24	0,28	4,00	3,73	26,19
28	0,27	3,94	2,17	26,82
31	0,28	4,00	1,61	27,62

Tabla 4.21. Resultados del experimento In40%-300 (40 % v/v inóculo y 300 rpm). Condiciones: 25 g/L de glicerol, 0 g/L de extracto de levadura, 30°C, pH libre.

Tiempo (h)	Biomasa (g/L)	pH	Glicerol (g/L)	DHA producida (g/L)
0	0,22	5,44	31,62	0,00
2	0,29	5,31	30,16	1,07
4	0,40	4,97	25,91	5,38
6	0,43	4,77	22,20	8,67
8	0,45	4,63	18,54	12,85
10	0,46	4,42	15,13	16,07
18	0,47	4,15	1,55	29,70
20	0,46	4,11	0,66	31,80
22	0,46	4,18	0,26	30,97
24	0,45	4,25	0,03	31,58

Tabla 4.22. Resultados del experimento *In5%-400* (5 % v/v inóculo y 400 rpm). Condiciones: 25 g/L de glicerol, 0 g/L de extracto de levadura, 30°C, pH libre.

Tiempo (h)	Biomasa (g/L)	pH	Glicerol (g/L)	DHA producida (g/L)
0	0,03	6,08	28,57	0,00
2	0,03	5,60	27,78	0,32
4	0,04	5,48	27,33	0,81
6	0,04	5,33	26,25	1,69
8	0,04	5,11	26,06	2,68
10	0,04	5,03	24,87	3,09
11	0,05	4,95	24,36	3,42
25	0,05	4,37	20,56	7,58
27	0,05	4,28	19,56	9,00
29	0,06	4,18	19,41	9,55
31	0,05	4,16	19,00	9,20

Tabla 4.23. Resultados del experimento *In10%-400* (10 % v/v inóculo y 400 rpm). Condiciones: 25 g/L de glicerol, 0 g/L de extracto de levadura, 30°C, pH libre.

Tiempo (h)	Biomasa (g/L)	pH	Glicerol (g/L)	DHA producida (g/L)
0	0,04	5,46	30,58	0,00
2	0,06	5,27	30,42	0,69
4	0,08	5,16	29,27	1,85
6	0,09	5,07	27,73	3,31
8	0,10	4,95	25,99	4,96
10	0,10	4,80	23,93	6,08
11	0,09	4,72	24,13	7,06
25	0,12	4,17	14,56	14,52
27	0,12	4,09	13,49	16,69
29	0,13	4,01	12,17	16,80
31	0,11	3,99	11,87	17,36

Tabla 4.24. Resultados del experimento *In20%-400* (20 % v/v inóculo y 400 rpm). Condiciones: 25 g/L de glicerol, 0 g/L de extracto de levadura, 30°C, pH libre.

Tiempo (h)	Biomasa (g/L)	pH	Glicerol (g/L)	DHA producida (g/L)
0	0,08	5,46	32,23	0,00
2	0,13	5,39	31,61	1,44
4	0,19	5,13	30,01	3,54
6	0,17	4,98	25,29	6,51
8	0,18	4,87	22,80	9,19
10	0,18	4,77	20,52	11,10
11	0,18	4,70	19,80	12,43
25	0,21	4,18	6,38	23,82
27	0,21	4,16	3,93	26,34
29	0,22	4,14	3,43	27,54
31	0,21	4,10	3,69	27,35

Tabla 4.25. Resultados del experimento *In40%-400* (40 % v/v inóculo y 400 rpm). Condiciones: 25 g/L de glicerol, 0 g/L de extracto de levadura, 30°C, pH libre.

Tiempo (h)	Biomasa (g/L)	pH	Glicerol (g/L)	DHA producida (g/L)
0	0,18	5,55	37,00	0,00
2	0,26	5,34	34,55	2,27
4	0,36	5,05	30,88	6,64
6	0,35	4,84	25,25	12,08
8	0,40	4,81	19,00	16,21
10	0,41	4,60	15,60	19,46
11	0,42	4,58	13,25	22,48
25	0,41	4,28	1,03	32,21
27	0,40	4,31	0,73	33,34
29	0,44	4,31	0,69	33,47
31	0,44	4,32	0,55	34,27

4.3.2 Discusión de los resultados

En las Figuras 4.7 a 4.10 se ha representado la evolución con el tiempo de la concentración de glicerol, DHA y biomasa, así como la caída del pH, para cada experimento realizado con distinto porcentaje de inóculo, a tres agitaciones distintas en cada caso. Todo ello con el objetivo de estudiar la influencia conjunta de la agitación y el porcentaje de inóculo (o concentración inicial de biomasa) en el proceso.

En primer lugar, la Figura 4.7 muestra los resultados de los experimentos iniciados con un porcentaje de inóculo del 5 % v/v a tres agitaciones distintas. En este caso, se observa que la agitación no ejerce ninguna influencia sobre el proceso, ya que los resultados de los tres experimentos aparecen solapados tanto en lo que respecta a la evolución con el tiempo de la concentración de glicerol, como de DHA y de biomasa, e incluso, la caída del pH también es idéntica. Algo similar se aprecia en la Figura 4.8, en la que están representados los resultados del experimento con un 10 % v/v de inóculo a las tres agitaciones. A pesar de haber duplicado el porcentaje de inóculo y, por tanto, la cantidad de biomasa inicial, la agitación no influye en los resultados; lo que significa que en ambos casos el transporte de oxígeno no es un factor limitante.

En cuanto a los experimentos realizados con un inóculo del 20 % v/v (Figura 4.9), se aprecian ligeras diferencias en la concentración final de DHA alcanzada, que pueden ser perfectamente achacables a que la concentración inicial de glicerol en los experimentos no es exactamente la misma. Lo mismo ocurre con la evolución del pH; en el experimento In20%-200 la caída del pH es menor porque la concentración inicial de glicerol es ligeramente inferior y, con ello, la producción de ácido glicérico. En términos de crecimiento de biomasa, también se aprecian pequeñas diferencias. No obstante, en general no parece que la agitación tenga grandes repercusiones.

Respecto a los resultados de los experimentos en los que se ha añadido mayor cantidad de inóculo (40 % v/v), se hallan diferencias significativas en la velocidad de producción de DHA al aumentar la agitación de 200 a 300 rpm, tal y como muestra la Figura 4.10 (b). Sin embargo, el incremento de la agitación de 300 a 400 rpm no se traduce en ningún cambio en la velocidad del proceso. Este hecho pone de manifiesto que a 200 rpm y con una concentración de biomasa inicial de 0,21 g/L, la agitación es un factor limitante. En los siguientes párrafos se va a profundizar en esta cuestión relacionando la actividad enzimática con la concentración de biomasa y la agitación.

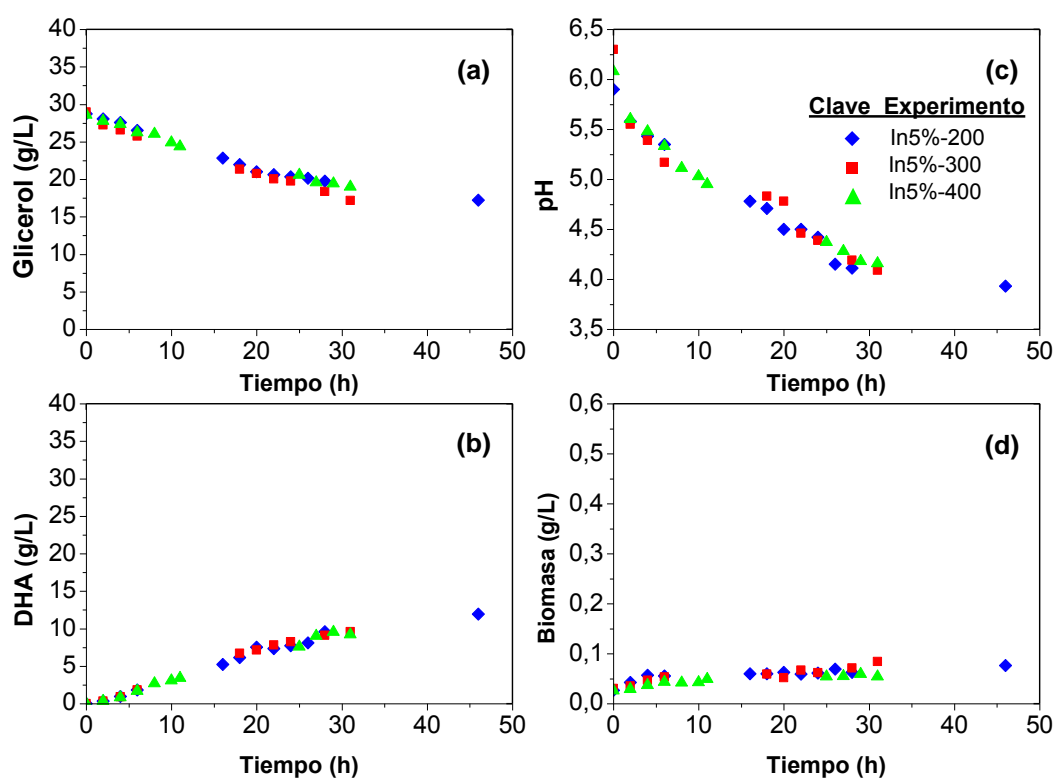


Figura 4.7. Evolución con el tiempo del glicerol (a); la DHA (b); el pH (c) y la biomasa (d) para los experimentos con un 5 % v/v de inóculo a 200 rpm, 300 rpm y 400 rpm (In5%-200, In5%-300, In5%-400).

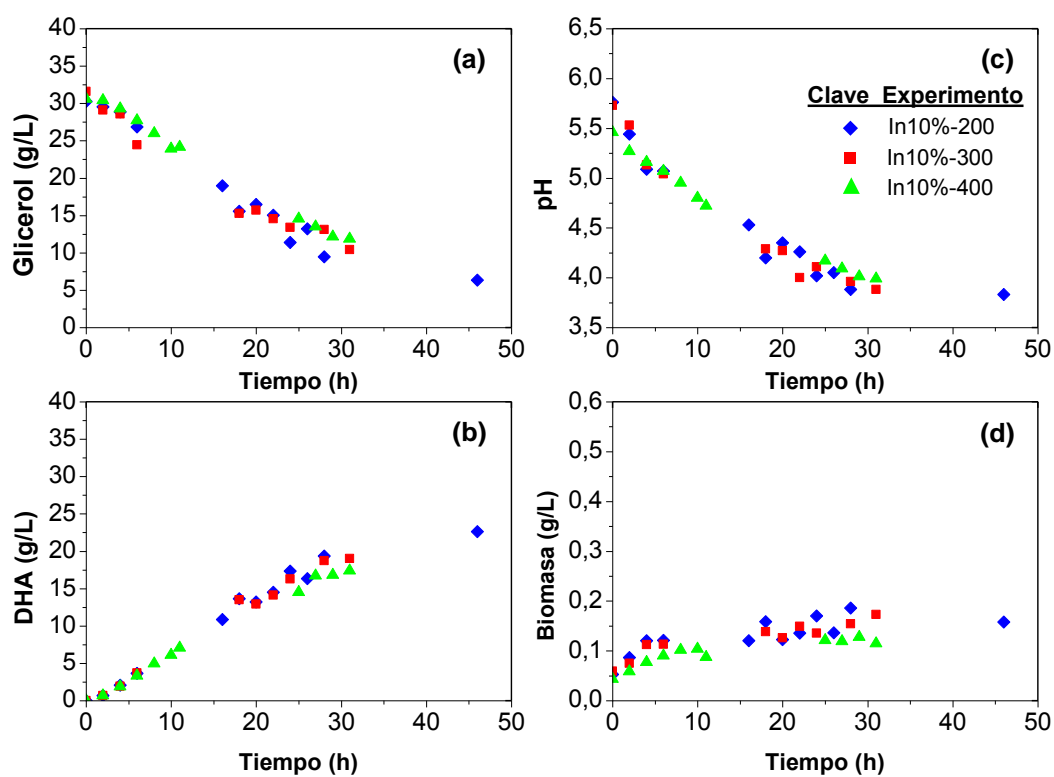


Figura 4.8. Evolución con el tiempo del glicerol (a); la DHA (b); el pH (c) y la biomasa (d) para los experimentos con un 10 % v/v de inóculo a 200 rpm, 300 rpm y 400 rpm (In10%-200, In10%-300, In10%-400).

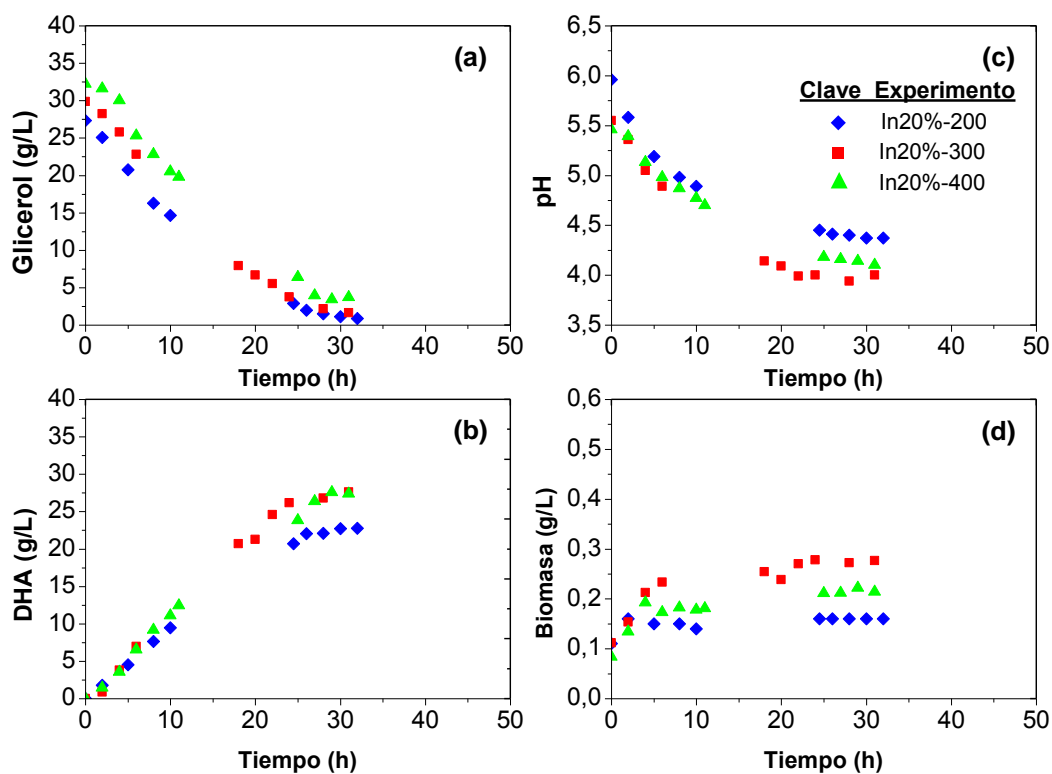


Figura 4.9. Evolución con el tiempo del glicerol (a); la DHA (b); el pH (c) y la biomasa (d) para los experimentos con un 20 % v/v de inóculo a 200 rpm, 300 rpm y 400 rpm (In20%-200, In20%-300, In20%-400).

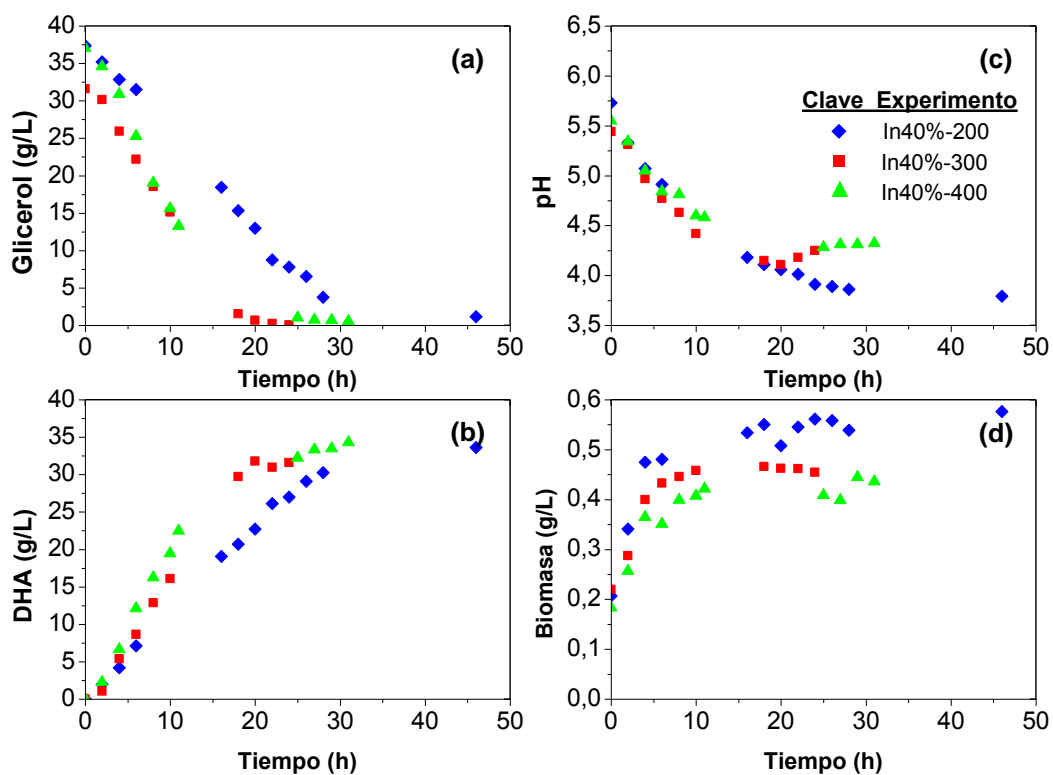


Figura 4.10. Evolución con el tiempo del glicerol (a); la DHA (b); el pH (c) y la biomasa (d) para los experimentos con un 40 % v/v de inóculo a 200 rpm, 300 rpm y 400 rpm (In40%-200, In40%-300, In40%-400).

Tras el análisis cualitativo, se va a proceder al cálculo de la actividad enzimática con el objetivo de determinar cuál es la influencia que ejercen tanto la concentración de biomasa, como la agitación, sobre la velocidad inicial de producción de DHA. Para ello, se ha calculado la pendiente de la curva de producción de DHA en el tramo lineal para cada experimento. En la Figura 4.11 se muestran gráficamente los ajustes realizados y en la Tabla 4.26 se recogen los valores de actividad enzimática obtenidos, así como la bondad de los ajustes y la concentración de biomasa máxima alcanzada en cada experimento. Dicha concentración de biomasa se va a tomar como referencia para establecer el vínculo entre actividad enzimática y concentración de biomasa, ya que, en todos los casos, la mayor parte de la producción de DHA transcurre cuando ya se ha alcanzado la fase estacionaria de crecimiento y, por tanto, con una concentración de biomasa constante.

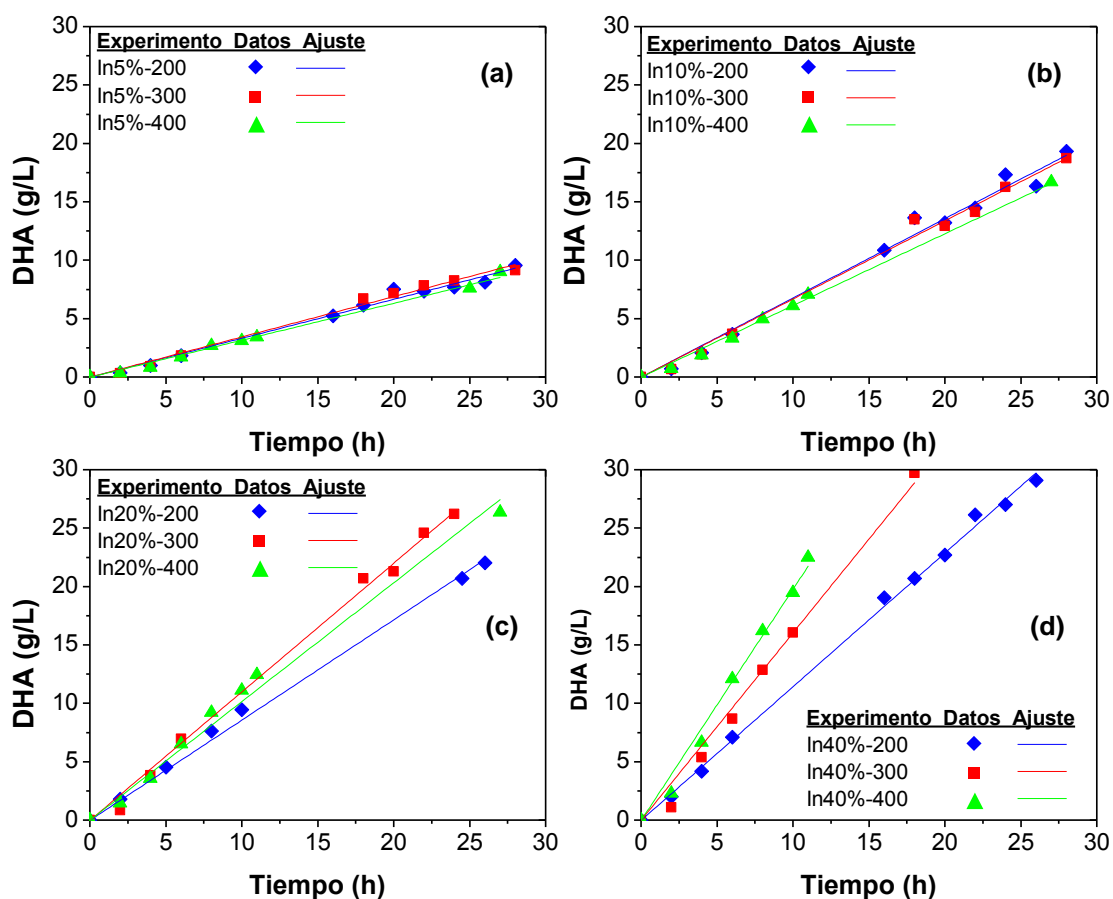


Figura 4.11. Representación de los ajustes lineales de los datos de concentración de DHA frente al tiempo para el cálculo de la actividad enzimática de los experimentos llevados a cabo con un porcentaje de inóculo del 5 % v/v (a); 10 % v/v (b); 20 % v/v (c) y 40 % v/v (d) a diferentes agitaciones (200, 300 y 400 rpm).

Tabla 4.26. Valores de actividad enzimática (a_0) de los experimentos realizados con distinto porcentaje de inóculo y a diferentes agitaciones.

Experimento	$C_X^{\text{máx}}$ (g/L)	a_0 (g _{DHA} /L·h)	r^2
In5%-200	0,06	0,33	0,996
In5%-300	0,06	0,34	0,996
In5%-400	0,05	0,32	0,995
In10%-200	0,12	0,68	0,996
In10%-300	0,14	0,67	0,996
In10%-400	0,12	0,61	0,997
In20%-200	0,17	0,86	0,998
In20%-300	0,24	1,10	0,998
In20%-400	0,21	1,02	0,994
In40%-200	0,55	1,14	0,999
In40%-300	0,43	1,61	0,994
In40%-400	0,44	1,98	0,995

Los datos de actividad enzimática se han representado en la Figura 4.12 frente a la concentración final de biomasa, a distintas agitaciones. En dicha figura se puede observar que la actividad enzimática es proporcional a la concentración de biomasa e independiente de la agitación, cuando la concentración de biomasa es inferior a 0,25 g/L, aunque este límite es difícil de definir debido a la ausencia de datos entre 0,25 y 0,4 g/L de biomasa. Estos resultados coinciden con los obtenidos en el ensayo de actividad enzimática descrito en el Apartado 3.2.3. Realizando un ajuste lineal en el tramo proporcional, se obtiene una relación entre actividad enzimática y concentración final de biomasa que responde a la ecuación [4.2].

$$a_0 \left(\frac{g_{DHA}}{L \cdot h} \right) = 4,94 \cdot C_X^{final} \quad \forall \quad C_X^{final} < 0,25 \text{ g/L} \quad \therefore \quad r^2 = 0,994 \quad [4.2]$$

Sin embargo, al aumentar la concentración final de biomasa, se produce una limitación en la actividad enzimática que se va reduciendo al aumentar la agitación, hasta llegar a ser casi proporcional a la concentración de biomasa a 400 rpm. Esto indica que la agitación es un factor limitante a elevadas concentraciones de biomasa, probablemente debido a que el transporte de oxígeno al líquido es insuficiente para todas las células presentes en el caldo, como se apuntaba al comienzo del Apartado 4.3.

Según Buchs (2001), el insuficiente aporte de oxígeno es uno de los problemas más frecuentes asociados al uso de matraces *Erlenmeyer* para el estudio de bioprocesos, dado que estos recipientes no permiten la monitorización en línea del oxígeno disuelto y el grado de agitación del líquido está limitado por las especificaciones técnicas del tipo de incubadora que se utilice en cada caso. Este hecho explicaría que no se apreciaran diferencias significativas en la velocidad inicial de producción de DHA al añadir fuente compleja al medio (Apartado 3.2); ya que la agitación empleada fue de 200 rpm, y por tanto, insuficiente para aportar oxígeno a toda la biomasa generada en los experimentos en los que se añadió peptona y/o extracto de levadura. Sin embargo, cabe destacar que esta limitación, producida por una agitación inadecuada, sólo afecta a la producción de DHA, pero no tiene ningún efecto en el crecimiento, tal y como se puede observar en la Figura 3.1 (e) (hay un mayor crecimiento al aumentar la cantidad de fuente compleja aunque la agitación sea de 200 rpm). Tampoco parece afectar a la producción de ácido glicérico, como se muestra en las Figuras 3.1 (c) y 4.6 (c) (dicha producción es proporcional a la cantidad de biomasa presente). De hecho, buscando datos similares en bibliografía, se ha hallado un trabajo en el que se cultivaban las células de *G. oxydans* bajo condiciones deficientes de oxígeno para limitar la producción de DHA al mínimo y conseguir altas concentraciones de biomasa (Izuo y col., 1980). En otro trabajo más reciente realizado con glicerol crudo se observa algo similar (Zheng y col., 2016).

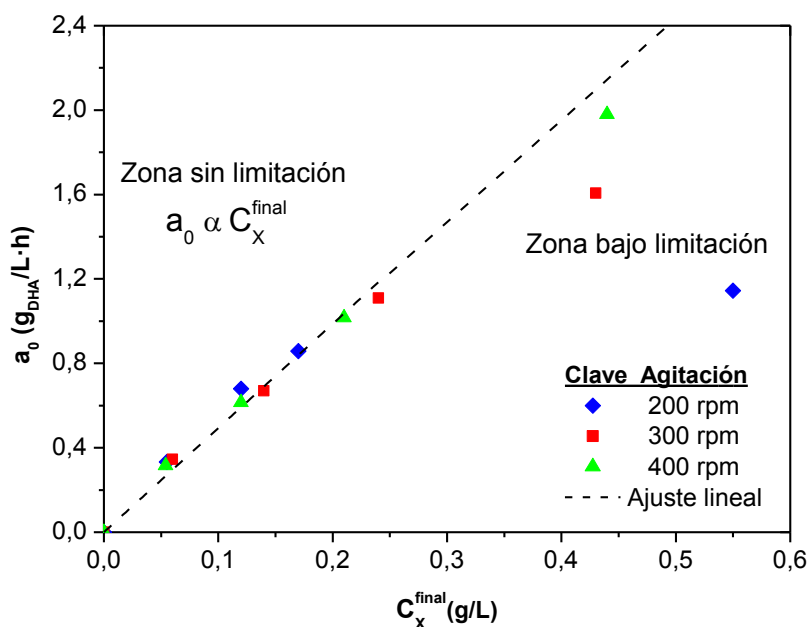


Figura 4.12. Efecto de la concentración final de biomasa (C_X^{final}) sobre la actividad enzimática de *G. oxydans* (a_0) a varias agitaciones en matraz Erlenmeyer. La línea discontinua representa el ajuste lineal de los datos experimentales en el tramo en el que a_0 es proporcional a C_X^{final} .

En este Apartado se ha puesto de manifiesto la importancia que presenta la agitación para que la actividad enzimática sea proporcional al número de células; esto es, para que la productividad específica no disminuya al aumentar la concentración de biomasa, como ocurría en el Capítulo 3. No obstante, el intervalo de concentraciones de biomasa estudiado no es lo suficientemente amplio como para poder modelizar este fenómeno mediante ecuaciones que lo describan. Por lo tanto, es aconsejable realizar un estudio más amplio de la influencia de la agitación y la concentración de biomasa sobre la actividad enzimática. Sin embargo, no tiene sentido operar con más de un 40 % v/v de inóculo y la adición de fuente compleja, aunque puede producir una concentración elevada de biomasa, de hasta 1 g/L según los estudios realizados en el Apartado 3.2, no es recomendable desde el punto de vista de la purificación posterior de la DHA, ya que interfiere en el proceso de cristalización y, con ello, en la economía del proceso (Yamada y col., 1979; Svitel y Sturdik, 1994; Hu y col., 2011). En este sentido, es mucho más ventajoso llevar a cabo el proceso de producción de DHA con células en estado de *resting cells*, ya que la composición del medio se simplifica considerablemente. Además, la operación en *resting cells* es perfectamente factible ya que la producción de DHA no está estrictamente asociada al crecimiento, como ya se comentó en el Apartado 2.1.1 al describir el metabolismo, y la actividad enzimática es idéntica haya o no crecimiento, siempre que la concentración de biomasa sea la misma, tal y como demuestran los datos que se presentan en la Figura 3.6 del Apartado 3.2.3, en la que se ha representado la actividad enzimática de experimentos en crecimiento y en *resting cells*. Por lo tanto, en el siguiente Capítulo se va a abordar el estudio de la producción de DHA con células en estado de *resting cells*, haciendo especial énfasis en la influencia de la agitación y la concentración de biomasa sobre la actividad enzimática, puesto que han resultado ser los factores clave para evitar que haya limitación por estas variables en la velocidad de producción.

4.4 BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Bories, A., Claret, C., Soucaille, P. 1991. Kinetic-study and optimization of the production of dihydroxyacetone from glycerol using *Gluconobacter oxydans*. *Process Biochemistry*, **26**(4), 243-248.
- Buchs, J. 2001. Introduction to advantages and problems of shaken cultures. *Biochemical Engineering Journal*, **7**(2), 91-98.
- García-Ochoa, F., Gómez, E. 2004. Theoretical prediction of gas-liquid mass transfer coefficient, specific area and hold-up in sparged stirred tanks. *Chemical Engineering Science*, **59**(12), 2489-2501.
- García-Ochoa, F., Gómez, E., Alcon, A., Santos, V.E. 2013. The effect of hydrodynamic stress on the growth of *Xanthomonas campestris* cultures in a stirred and sparged tank bioreactor. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, **36**(7), 911-925.
- Hinshelwood, C.N. 1946. *The chemical kinetics of the bacterial cell*. Clarendon Press Oxford.
- Hu, Z.-C., Liu, Z.-Q., Zheng, Y.-G., Shen, Y.-C. 2010a. Production of 1,3-dihydroxyacetone from glycerol by *Gluconobacter oxydans* ZJB09112. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, **20**(2), 340-345.
- Hu, Z.-C., Zheng, Y.-G., Shen, Y.-C. 2010b. Dissolved-oxygen-stat fed-batch fermentation of 1,3-dihydroxyacetone from glycerol by *Gluconobacter oxydans* ZJB09112. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, **15**(4), 651-656.
- Hu, Z.-C., Zheng, Y.-G., Shen, Y.-C. 2011. Use of glycerol for producing 1,3-dihydroxyacetone by *Gluconobacter oxydans* in an airlift bioreactor. *Bioresource Technology*, **102**(14), 7177-7182.
- Izuo, N., Nabe, K., Yamada, S., Chibata, I. 1980. Studies on aerobic fermentation .7. Production of dihydroxyacetone by continuous cultivation of *Acetobacter suboxydans*. *Journal of Fermentation Technology*, **58**(3), 221-226.

- Liu, Y.S., Wu, H.Y., Ho, K.P. 2006. Characterization of oxygen transfer conditions and their effects on *Phaffia rhodozyma* growth and carotenoid production in shake-flask cultures. *Biochemical Engineering Journal*, **27**(3), 331-335.
- Matsushita, K., Nagatani, Y., Shinagawa, E., Adachi, O., Ameyama, M. 1989. Effect of extracellular pH on the respiratory-chain and energetics of *Gluconobacter suboxydans*. *Agricultural and Biological Chemistry*, **53**(11), 2895-2902.
- Najafpour, G.D. 2007. *Biochemical engineering and biotechnology*. Elsevier.
- Ohrem, H.L., Voss, H. 1995. Kinetics of polyol oxidation with *Gluconobacter oxydans*. *Biotechnology Letters*, **17**(11), 1195-1200.
- Olijve, W., Kok, J.J. 1979. Analysis of growth of *Gluconobacter oxydans* in glucose containing media. *Archives of Microbiology*, **121**(3), 283-290.
- Riet, K., Tramper, J. 1991. *Basic bioreactor design*. Taylor & Francis.
- Svitel, J., Sturdik, E. 1994. Product yield and by-product formation in glycerol conversion to dihydroxyacetone by *Gluconobacter oxydans*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **78**(5), 351-355.
- Wei, S., Song, Q., Wei, D. 2007. Repeated use of immobilized *Gluconobacter oxydans* cells for conversion of glycerol to dihydroxyacetone. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, **37**(1), 67-76.
- Yamada, S., Nabe, K., Izuo, N., Chibata, I. 1979. Studies on aerobic fermentation .5. Enzymatic production of dihydroxyacetone by *Acetobacter suboxydans* ATCC-621. *Journal of Fermentation Technology*, **57**(3), 221-226.
- Zheng, X.-j., Jin, K.-q., Zhang, L., Wang, G., Liu, Y.-P. 2016. Effects of oxygen transfer coefficient on dihydroxyacetone production from crude glycerol. *brazilian journal of microbiology*, **47**(1), 129-135.

CAPÍTULO 5.

ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE DHA CON *RESTING CELLS*

CAPÍTULO 5.

ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE DHA EN RESTING CELLS

Índice

5.1	ESTUDIOS EN <i>ERLENMEYER</i> -INCUBADORA ORBITAL.....	222
5.1.1	Elección del tampón	222
5.1.2	Estudio de la agitación y de la concentración de biomasa	237
5.2	ESTUDIOS EN BIORREACTOR STBR.....	255
5.2.1	Efecto de k_La sobre la actividad enzimática (a_0).....	274
5.2.2	Efecto de k_La sobre la producción de ácido glicérico.....	279
5.3	BIBLIOGRAFÍA CITADA.....	282

CAPÍTULO 5.

ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE DHA EN *RESTING CELLS*

Los estudios precedentes han demostrado que la velocidad de producción de DHA depende fundamentalmente de la concentración de biomasa presente en el medio y de la agitación, independientemente del crecimiento, ya que la producción de DHA no está estrictamente asociada al mismo. Además, para que haya un buen crecimiento de *G. oxydans* se requiere el uso de medios complejos, cuya composición interfiere de manera notable en las etapas posteriores de aislamiento y recuperación del producto, principalmente en la etapa de cristalización de DHA. Dicho proceso de cristalización resulta fuertemente inhibido por la presencia de glicerol residual y otras impurezas, fundamentalmente especies iónicas, en el caldo de producción. De hecho, aunque el rendimiento del bioproceso en la etapa de transformación alcance el 94%, el rendimiento global del proceso puede disminuir hasta el 75% como consecuencia de la ineficiencia de la operación de cristalización debido a las impurezas (Svitel y Sturdik, 1994). En consecuencia, teniendo en cuenta que las etapas de purificación y cristalización de DHA constituyen la mayor parte del coste total de este proceso (Hu y col., 2011), conviene reducir las impurezas del caldo de reacción al máximo para disminuir los costes del proceso y hacerlo más competitivo.

En este sentido, la producción de DHA usando células en estado de reposo o *resting cells* (en ausencia de crecimiento) resulta muy atractiva dado que el medio de producción únicamente requiere una fuente de carbono, glicerol en este caso, y un tampón para mantener el pH en un intervalo apto para la supervivencia celular y la producción de DHA. Además, otra de las ventajas de esta forma de operar, es que la etapa de producción se puede llevar a cabo en condiciones no estériles, ya que el medio carece de fuente de nitrógeno, necesaria para el crecimiento microbiano.

Por lo tanto, el objetivo del presente Capítulo es llevar a cabo el estudio de la producción de DHA usando células en estado de *resting cells*. Para ello, se realizarán unos estudios previos en incubadora orbital consistentes en seleccionar, en primer lugar, el tampón más adecuado para realizar el proceso; y, en segundo lugar, en estudiar el efecto simultáneo de la agitación y la concentración de biomasa sobre la actividad

enzimática, pero de manera más exhaustiva que en el Apartado 4.3. En este caso, al tratarse de una operación con *resting cells*, es posible fijar la concentración de biomasa con la que se va a trabajar y, con ello, la ampliación del intervalo de concentraciones de biomasa objeto de estudio, permitiendo la modelización del fenómeno. Además, se llevarán a cabo experimentos en *resting cells* a mayor escala, en un recipiente con un contacto entre fases más parecido al que se emplea industrialmente, como es un biorreactor tipo tanque agitado (STBR), haciendo énfasis en el estudio de los requerimientos de oxígeno del cultivo.

5.1 ESTUDIOS EN ERLENMEYER-INCUBADORA ORBITAL

A pesar de las limitaciones que se dan al trabajar con matraces *Erlenmeyer* en incubadoras de tipo orbital, como la dificultad de monitorizar el oxígeno disuelto o el estrecho intervalo de agitaciones de trabajo que ofrece una incubadora, estos sistemas siguen constituyendo una herramienta muy útil para la realización de un gran número de experimentos simultáneamente por su sencillez y simplicidad en la programación de experimentos. Por ello, son ampliamente utilizados en el desarrollo de bioprocesos, especialmente en la etapa de estudios previos. En este caso, los estudios de elección del tampón para llevar a cabo el proceso con *resting cells* y los primeros estudios sobre la influencia de la agitación y la concentración de biomasa, se van a llevar a cabo en matraces de tipo *Erlenmeyer*, agitados en incubadora orbital, de manera análoga a la realización de los experimentos en Capítulos anteriores.

5.1.1 Elección del tampón

La elección de un tampón adecuado es fundamental para amortiguar la caída del pH, ya que, como se ha descrito en los Capítulos anteriores, la producción de ácido glicérico es proporcional a la cantidad de biomasa presente. Por lo tanto, es necesario evitar, mediante la adición de un tampón, que en aquellos experimentos en los que se emplean altas concentraciones de biomasa se produzca la inhibición del proceso por el descenso del pH hacia valores por debajo de 4.

Analizando la composición de los medios consultados en la bibliografía para este proceso (Tabla 3.1), destacan los tampones fosfato (K_2HPO_4 y KH_2PO_4) y carbonato ($CaCO_3$) por su frecuencia de uso. Pero además, se han preseleccionado los tampones citrato ($NaH_2(C_3H_5O(COO)_3)$) y acetato ($NaCH_3COO$) para la realización de

un estudio previo más completo. En dicho estudio, se probaron los cuatro tampones con distintas concentraciones: 10, 20, 50 y 100 mM.

Los resultados experimentales ponen de manifiesto que los tampones citrato y carbonato inhiben el proceso, e incluso, este último, al ser sólido e insoluble en agua, interfiere en la medición de la concentración de biomasa. Por el contrario, los tampones fosfato y acetato no influyen negativamente en el proceso, siempre y cuando la concentración no sea mayor de 20 mM. Por ello, en este Apartado se va a estudiar la capacidad amortiguadora del pH de los tampones fosfato y acetato, ambos con una concentración de 20 mM, empleando *resting cells* en un intervalo de concentraciones entre 0,01 y 1 g/L de biomasa, con el objetivo de seleccionar aquél que mejores resultados proporcione y poder continuar con los estudios posteriores relativos a la influencia de la agitación y de la concentración de biomasa, como ya se ha comentado anteriormente.

Los experimentos se han llevado a cabo en matraz *Erlenmeyer* con un medio compuesto por 25 g/L de glicerol y el tampón seleccionado, a 30 °C y 200 rpm. Aunque ese valor de agitación influye negativamente en la velocidad de producción de DHA cuando la concentración de biomasa es elevada, tal y como se puso de manifiesto en el Apartado 4.3.2, no afecta a la producción de ácido glicérico, por lo que es válida para el estudio propuesto sobre el efecto de los dos tampones. En la Tabla 5.1 se muestra la planificación experimental, indicando para cada caso el código del experimento, la concentración de biomasa empleada y el tampón añadido.

Tabla 5.1. Planificación experimental para el estudio de la capacidad amortiguadora de los tampones fosfato y acetato en la producción de DHA usando resting cells.

Experimento	C _x (g/L)	Tampón (20 mM)
R1fosfato	1	Fosfato
R0,5fosfato	0,5	
R0,1fosfato	0,1	
R0,05fosfato	0,05	
R0,01fosfato	0,01	
R1acetato	1	Acetato
R0,5acetato	0,5	
R0,4acetato	0,4	
R0,3acetato	0,3	
R0,2acetato	0,2	
R0,1acetato	0,1	
R0,05acetato	0,05	
R0,01acetato	0,01	

➤ Resultados experimentales

En las Tablas 5.2 a 5.14 se recogen los datos de la evolución con el tiempo del pH y de las concentraciones de glicerol, DHA y ácido glicérico, para los experimentos con distintas concentraciones de biomasa realizados con tampón fosfato y acetato.

Tabla 5.2. Resultados del experimento con resting cells *R1*fosfato. Condiciones: 25 g/L de glicerol, tampón fosfato, 30°C, 200 rpm, incubadora orbital, $C_x = 1$ g/L.

Tiempo (h)	pH	Glicerol (g/L)	DHA producida (g/L)	Ácido glicérico producido (g/L)
0	5,97	27,60	0,00	0,00
2	4,55	25,22	2,32	0,06
3	4,35	24,12	3,35	0,11
4	4,21	22,69	4,66	0,18
16	3,41	9,20	17,41	0,88
20	3,36	7,02	19,76	0,97
22	3,37	6,01	20,97	1,07
26	3,38	4,26	22,39	1,13
29,5	3,38	4,16	22,14	1,10
40	3,37	3,36	23,54	1,12
49	3,30	3,07	23,51	1,07

Tabla 5.3. Resultados del experimento con resting cells *R0,5*fosfato. Condiciones: 25 g/L de glicerol, tampón fosfato, 30°C, 200 rpm, incubadora orbital, $C_x = 0,5$ g/L.

Tiempo (h)	pH	Glicerol (g/L)	DHA producida (g/L)	Ácido glicérico producido (g/L)
0	6,07	28,22	0,00	0,00
2	5,12	25,60	2,40	0,04
3	4,69	24,47	3,59	0,09
4	4,46	22,84	5,06	0,15
16	3,54	10,10	17,36	0,62
20	3,49	6,15	21,26	0,70
22	3,52	5,90	21,52	0,72
26	3,53	4,96	22,05	0,73
29,5	3,51	4,49	22,95	0,76
40	3,5	3,75	23,98	0,78
49	3,45	3,45	23,47	0,75

Tabla 5.4. Resultados del experimento con resting cells R0,1fosfato. Condiciones: 25 g/L de glicerol, tampón fosfato, 30°C, 200 rpm, incubadora orbital, $C_X = 0,1$ g/L.

Tiempo (h)	pH	Glicerol (g/L)	DHA producida (g/L)	Ácido glicérico producido (g/L)
0	6,11	29,93	0,00	0,00
2	5,95	27,44	1,80	0,03
3	5,89	26,62	2,67	0,04
4	5,83	25,55	3,56	0,05
16	4,57	13,81	15,97	0,12
20	4,28	9,02	20,66	0,16
22	4,28	8,40	21,30	0,15
26	4,21	5,45	24,28	0,19
29,5	4,14	4,73	24,99	0,19
40	4,08	1,45	28,25	0,22
49	4,01	1,36	28,35	0,20

Tabla 5.5. Resultados del experimento con resting cells R0,05fosfato. Condiciones: 25 g/L de glicerol, tampón fosfato, 30°C, 200 rpm, incubadora orbital, $C_X = 0,05$ g/L.

Tiempo (h)	pH	Glicerol (g/L)	DHA producida (g/L)	Ácido glicérico producido (g/L)
0	6,14	30,89	0,00	0,00
2	6,06	29,40	0,97	0,02
3	6,04	28,97	1,47	0,03
4	6,02	28,48	1,96	0,04
16	5,48	23,05	8,65	0,06
20	5,24	20,46	10,84	0,08
22	5,26	18,54	12,99	0,09
26	4,99	17,18	14,52	0,13
29,5	4,82	15,22	15,99	0,14
40	4,52	9,82	21,34	0,15
49	4,35	8,32	22,83	0,15

Tabla 5.6. Resultados del experimento con resting cells *R0,01fosfato*. Condiciones: 25 g/L de glicerol, tampón fosfato, 30°C, 200 rpm, incubadora orbital, $C_X = 0,01$ g/L.

Tiempo (h)	pH	Glicerol (g/L)	DHA producida (g/L)	Ácido glicérico producido (g/L)
0	6,15	32,66	0,00	0,00
2	6,13	32,18	0,23	0,00
3	6,12	32,04	0,36	0,00
4	6,11	31,95	0,46	0,02
16	6,02	30,21	2,37	0,04
20	5,92	29,31	3,26	0,06
22	5,99	29,07	3,49	0,09
26	5,96	28,55	3,99	0,10
40	5,93	26,58	5,94	0,11

Tabla 5.7. Resultados del experimento con resting cells *R1acetato*. Condiciones: 25 g/L de glicerol, tampón acetato, 30°C, 200 rpm, incubadora orbital, $C_X = 1$ g/L.

Tiempo (h)	pH	Glicerol (g/L)	DHA producida (g/L)	Ácido glicérico producido (g/L)
0	5,56	27,40	0,00	0,00
2	5,45	24,65	2,63	0,04
4	5,38	21,66	5,42	0,12
8	5,26	15,35	10,66	0,24
16	5,06	2,80	23,56	0,62
18	5,03	1,23	23,56	0,70
20	4,97	0,48	24,25	0,78
22	4,95	0,14	24,51	0,82
24	4,91	0,19	24,68	0,84
26	4,93	0,17	26,07	0,93
28	4,94	0,22	24,78	0,90
42	4,94	0,28	25,00	0,94

Tabla 5.8. Resultados del experimento con resting cells R0,5acetato. Condiciones: 25 g/L de glicerol, tampón acetato, 30°C, 200 rpm, incubadora orbital, $C_x = 0,5$ g/L.

Tiempo (h)	pH	Glicerol (g/L)	DHA producida (g/L)	Ácido glicérico producido (g/L)
0	5,54	27,78	0,00	0,00
2	5,49	25,24	2,53	0,03
4	5,40	22,98	5,04	0,09
8	5,29	16,85	10,56	0,21
16	5,00	6,06	20,30	0,58
18	4,95	4,10	21,08	0,62
20	4,91	2,39	22,47	0,68
22	4,89	1,20	24,46	0,74
24	4,86	0,75	24,43	0,74
26	4,86	0,38	25,84	0,78
28	4,86	0,52	24,34	0,80
42	4,88	0,42	25,13	0,85

Tabla 5.9. Resultados del experimento con resting cells R0,4acetato. Condiciones: 25 g/L de glicerol, tampón acetato, 30°C, 200 rpm, incubadora orbital, $C_x = 0,4$ g/L.

Tiempo (h)	pH	Glicerol (g/L)	DHA producida (g/L)	Ácido glicérico producido (g/L)
0	5,53	27,93	0,00	0,00
2	5,48	25,51	2,68	0,03
4	5,40	23,44	5,32	0,09
8	5,27	17,96	10,03	0,18
16	5,03	6,83	20,17	0,48
18	4,99	4,91	21,19	0,53
20	4,97	3,24	21,91	0,55
22	4,94	1,95	23,75	0,61
24	4,95	1,15	24,33	0,61
26	4,95	0,76	25,57	0,70
28	4,95	0,58	24,73	0,73
42	4,95	0,49	25,31	0,78

Tabla 5.10. Resultados del experimento con resting cells R0,3acetato. Condiciones: 25 g/L de glicerol, tampón acetato, 30°C, 200 rpm, incubadora orbital, $C_X = 0,3$ g/L.

Tiempo (h)	pH	Glicerol (g/L)	DHA producida (g/L)	Ácido glicérico producido (g/L)
0	5,54	29,14	0,00	0,00
2	5,46	26,79	2,75	0,03
4	5,41	23,54	5,36	0,07
8	5,31	18,12	10,32	0,15
16	5,08	7,66	20,61	0,44
18	4,99	5,52	21,64	0,46
20	4,99	3,73	22,64	0,49
22	5,00	2,74	24,01	0,52
24	5,02	1,79	24,69	0,54
26	5,01	0,87	26,58	0,59
28	4,99	0,90	25,34	0,55
42	4,95	0,40	26,60	0,62

Tabla 5.11. Resultados del experimento con resting cells R0,2acetato. Condiciones: 25 g/L de glicerol, tampón acetato, 30°C, 200 rpm, incubadora orbital, $C_X = 0,2$ g/L.

Tiempo (h)	pH	Glicerol (g/L)	DHA producida (g/L)	Ácido glicérico producido (g/L)
0	5,55	28,04	0,00	0,00
2	5,49	26,47	2,05	0,02
4	5,44	23,69	4,37	0,04
8	5,35	19,42	8,64	0,09
16	5,26	10,99	15,96	0,16
18	5,19	9,48	16,64	0,19
20	5,18	7,70	17,73	0,21
22	5,16	6,58	18,84	0,23
24	5,17	5,23	20,04	0,26
26	5,12	4,32	22,27	0,30
28	5,08	3,15	22,08	0,29
42	5,07	0,68	25,13	0,45

Tabla 5.12. Resultados del experimento con resting cells R0,1acetato. Condiciones: 25 g/L de glicerol, tampón acetato, 30°C, 200 rpm, incubadora orbital, $C_X = 0,1$ g/L.

Tiempo (h)	pH	Glicerol (g/L)	DHA producida (g/L)	Ácido glicérico producido (g/L)
0	5,53	26,77	0,00	0,00
2	5,51	25,71	1,06	0,02
3	5,49	24,92	1,73	0,03
8	5,41	22,07	4,51	0,07
17	5,36	16,24	10,15	0,15
19	5,36	15,60	10,98	0,17
25	5,29	12,45	14,05	0,23
27	5,27	11,57	14,78	0,24
28,5	5,25	10,91	15,62	0,26
42	5,22	5,06	21,21	0,32
45	5,22	4,94	21,03	0,36

Tabla 5.13. Resultados del experimento con resting cells R0,05acetato. Condiciones: 25 g/L de glicerol, tampón acetato, 30°C, 200 rpm, incubadora orbital, $C_X = 0,05$ g/L.

Tiempo (h)	pH	Glicerol (g/L)	DHA producida (g/L)	Ácido glicérico producido (g/L)
0	5,54	28,09	0,00	0,00
2	5,51	27,79	0,53	0,00
3	5,50	27,19	0,90	0,03
8	5,46	25,09	2,95	0,04
17	5,43	21,68	6,33	0,09
19	5,43	21,07	6,81	0,11
25	5,35	19,16	8,74	0,15
27	5,34	18,61	9,29	0,18
28,5	5,32	17,87	9,94	0,22
42	5,32	14,57	13,25	0,26
45	5,32	14,31	13,51	0,24

Tabla 5.14. Resultados del experimento con resting cells *R0,01acetato*. Condiciones: 25 g/L de glicerol, tampón acetato, 30°C, 200 rpm, incubadora orbital, $C_X = 0,01$ g/L.

Tiempo (h)	pH	Glicerol (g/L)	DHA producida (g/L)	Ácido glicérico producido (g/L)
0	5,52	28,87	0,00	0,00
2	5,52	28,74	0,14	0,00
3	5,52	28,68	0,20	0,00
8	5,51	28,40	0,56	0,00
17	5,51	27,81	1,19	0,00
19	5,52	27,36	1,31	0,00
25	5,48	26,95	1,77	0,00
27	5,48	26,82	1,87	0,00
28,5	5,46	26,63	2,06	0,00
42	5,48	25,72	2,92	0,00
45	5,49	25,59	3,00	0,00

➤ Discusión de los resultados

En las Figuras 5.1 y 5.2 se muestran los resultados de los experimentos llevados a cabo con tampón fosfato y acetato, respectivamente. En ambas figuras se observa que el empleo de concentraciones de biomasa elevadas ($C_X \geq 0,1$ g/L, en el caso del tampón fosfato, y $C_X \geq 0,3$ g/L, en el caso del tampón acetato) hace que la velocidad de producción de DHA permanezca invariante e independiente de la cantidad de biomasa presente. Este hecho, como ya se ha comentado, es debido al insuficiente aporte de oxígeno al usar una agitación baja (200 rpm). Sin embargo, la producción de ácido glicérico no se ve afectada por la limitación anterior, ya que guarda una relación directa con la concentración de biomasa; siendo mayor, cuanto mayor es la cantidad de biomasa presente en el medio, tal y como se puede apreciar en las Figuras 5.1 (c) y 5.2 (c). Estas observaciones son las esperadas de acuerdo con los resultados descritos en el Capítulo 4. Atendiendo a la evolución del pH de los experimentos realizados con tampón fosfato, Figura 5.1 (d), se observa que dicho tampón no es capaz de amortiguar la caída del pH provocada por la producción de ácido glicérico. De hecho, en los experimentos con mayor concentración de biomasa (*R1fosfato* y *R0,5fosfato*), el pH cae por debajo de 4 en menos de 10 horas, lo que induce una parada del proceso debido a la afectación de la

cadena respiratoria, como se apuntaba en el Apartado 4.2 de esta Memoria. Este efecto se puede apreciar con mayor claridad en la Figura 5.1 (a), en la cual se muestra que a partir de las 15 horas de cultivo no se produce apenas consumo de glicerol, quedando sustrato remanente al final del experimento. Por el contrario, los resultados de la Figura 5.2 (d) demuestran la capacidad del tampón acetato para mantener el pH en valores aceptables (en torno a 5) en todos los casos.

Por otra parte, con el fin de evaluar la influencia de los tampones en la actividad enzimática, se ha calculado la velocidad inicial de producción de DHA mediante regresión lineal de los datos de concentración de DHA frente al tiempo. Las Figuras 5.3 y 5.4 muestran los resultados de los ajustes para los experimentos con tampón fosfato y acetato, respectivamente. En la Tabla 5.15 se pueden observar los valores de actividad enzimática obtenidos en cada caso, así como la bondad de los ajustes.

Tabla 5.15. Valores de actividad enzimática (a_0) de los experimentos realizados con distintas concentraciones de resting cells y tampón fosfato y acetato, a 200 rpm.

Experimento	C_X (g/L)	a_0 (g _{DHA} /L·h)	r^2
R1fosfato	1	1,15	0,999
R0,5fosfato	0,5	1,14	0,999
R0,1fosfato	0,1	0,89	0,999
R0,05fosfato	0,05	0,49	0,999
R0,01fosfato	0,01	0,12	0,999
R1acetato	1	1,34	0,999
R0,5acetato	0,5	1,31	0,999
R0,4acetato	0,4	1,27	0,999
R0,3acetato	0,3	1,30	0,999
R0,2acetato	0,2	1,08	0,999
R0,1acetato	0,1	0,56	0,999
R0,05acetato	0,05	0,36	0,990
R0,01acetato	0,01	0,07	0,997

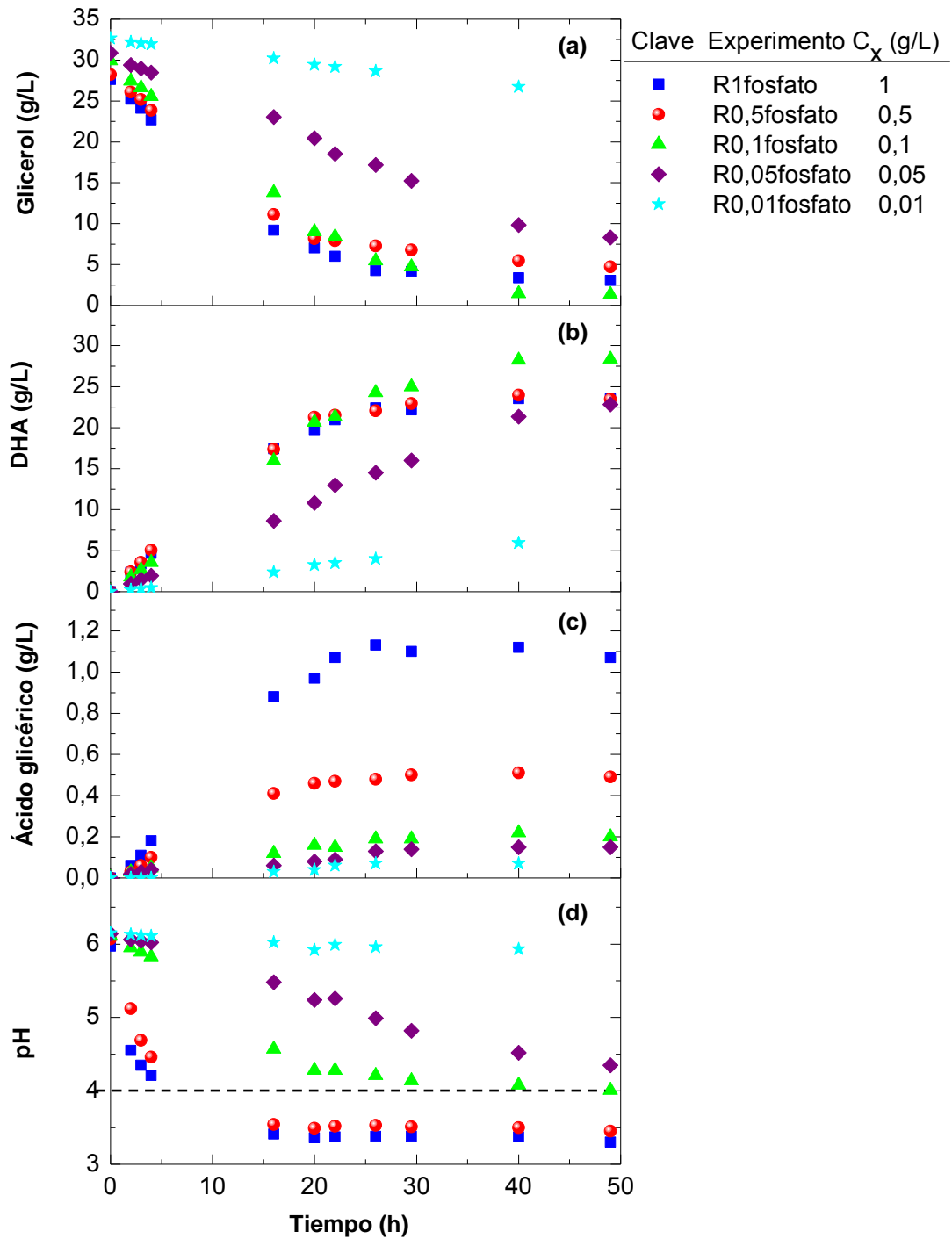


Figura 5.1. Evolución con el tiempo del glicerol (a); la DHA (b); el ácido glicérico (c) y el pH (d) para los experimentos realizados a 200 rpm con tampón fosfato y diferentes concentraciones de resting cells.

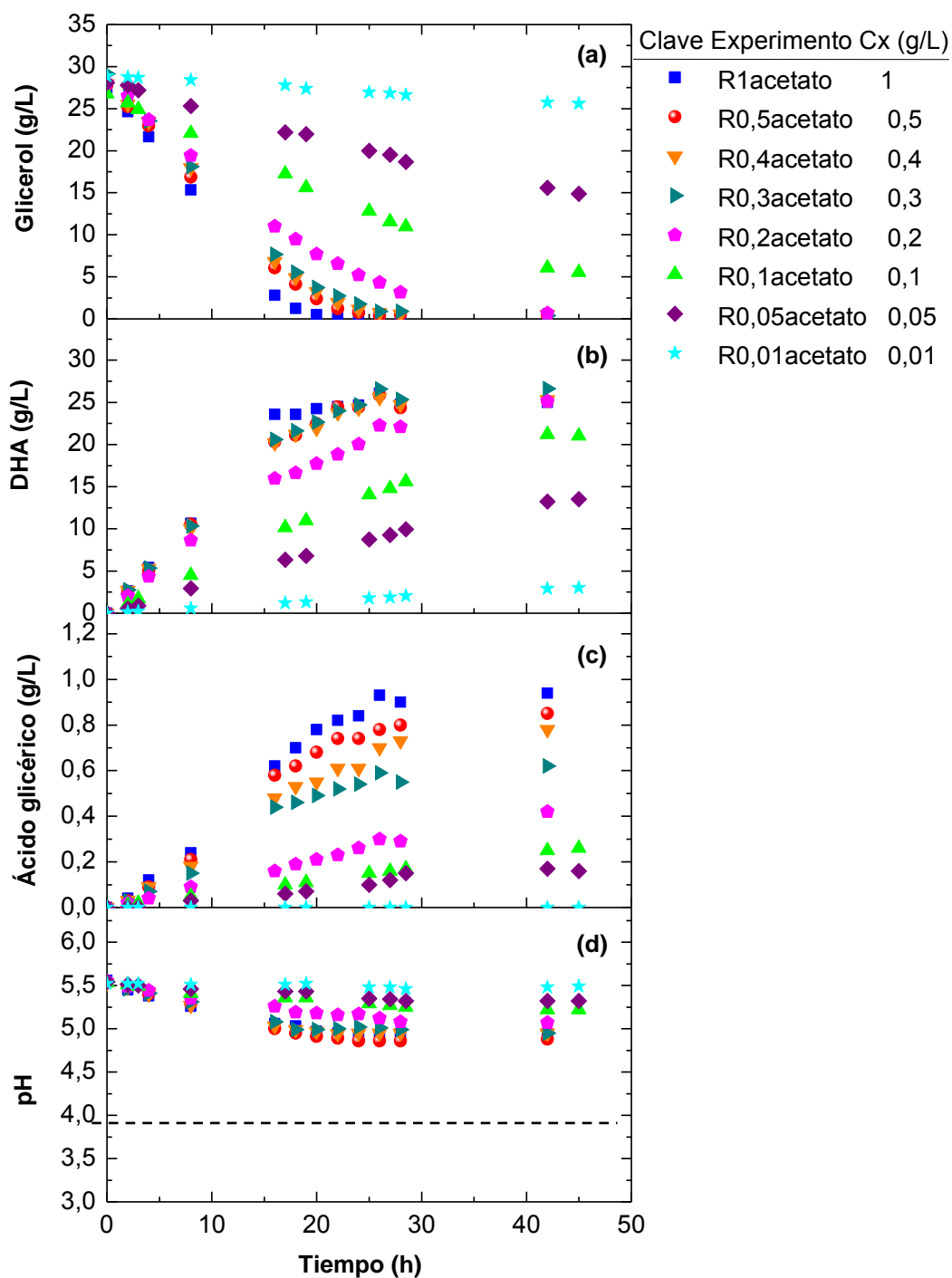


Figura 5.2. Evolución con el tiempo del glicerol (a); la DHA (b); el ácido glicérico (c) y el pH (d) para los experimentos realizados a 200 rpm con tampón acetato y diferentes concentraciones de resting cells.

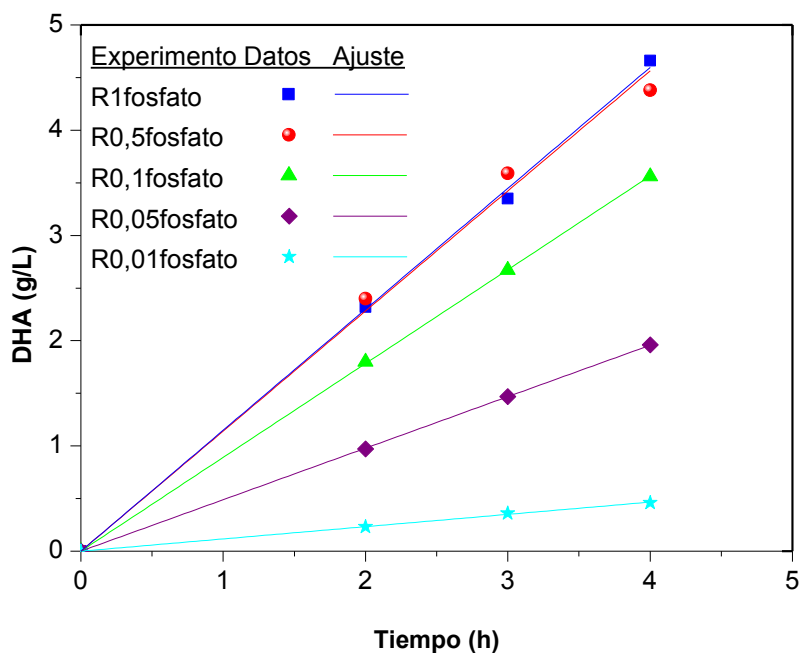


Figura 5.3. Representación de los ajustes lineales de los datos de concentración de DHA frente al tiempo para los experimentos realizados a 200 rpm con diferentes concentraciones de resting cells y tampón fosfato para el cálculo de la actividad enzimática.

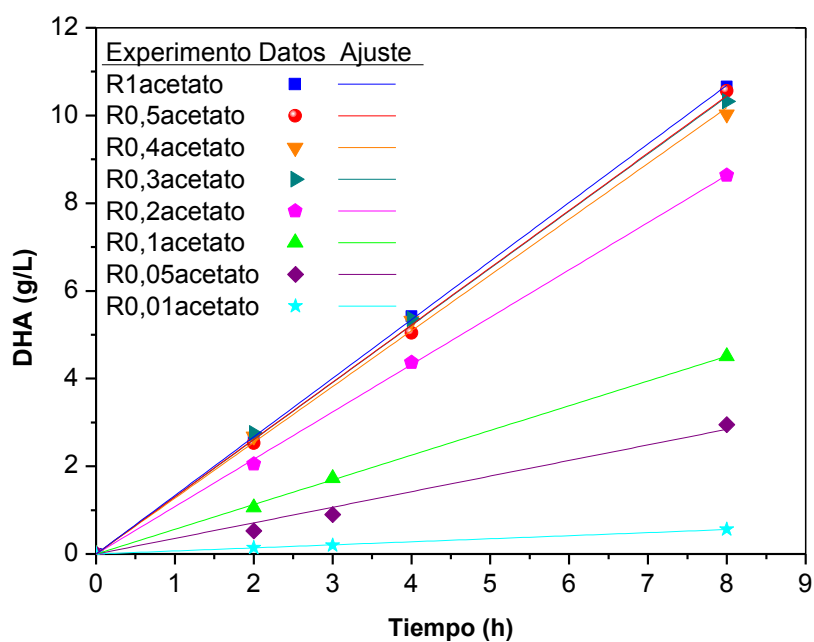


Figura 5.4. Representación de los ajustes lineales de los datos de concentración de DHA frente al tiempo para los experimentos realizados a 200 rpm con diferentes concentraciones de resting cells y tampón acetato para el cálculo de la actividad enzimática.

Los resultados de actividad enzimática se han representado en función de la concentración de biomasa. En la Figura 5.5 se aprecia nuevamente cómo la actividad enzimática deja de ser proporcional a la concentración de biomasa cuando esta última alcanza un valor elevado, debido a que el oxígeno empieza a ser un factor limitante en el proceso. No obstante, este aspecto se estudiará con más detalle en el siguiente Apartado. La relación entre actividad enzimática y concentración de biomasa en este tramo se puede expresar mediante las ecuaciones [5.1] y [5.2] para los tampones fosfato y acetato, respectivamente.

$$\text{Tampón fosfato: } a_0 \left(\frac{g_{DHA}}{L \cdot h} \right) = 9,10 \cdot C_X \quad \forall \quad C_X \leq 0,1 \text{ g/L} \quad \therefore \quad r^2 = 0,992 \quad [5.1]$$

$$\text{Tampón acetato: } a_0 \left(\frac{g_{DHA}}{L \cdot h} \right) = 5,53 \cdot C_X \quad \forall \quad C_X \leq 0,2 \text{ g/L} \quad \therefore \quad r^2 = 0,985 \quad [5.2]$$

Prestando atención al tramo en el que la actividad enzimática es proporcional a la concentración de biomasa, resulta curioso observar que el uso de tampón fosfato conduce a valores más elevados que el empleo de tampón acetato. Sin embargo, para concentraciones más altas de biomasa, el tampón acetato mejora los valores de actividad enzimática en comparación con los obtenidos con tampón fosfato. Este hecho no puede achacarse a la diferente evolución del pH porque ya se comprobó en el Capítulo 4 que no influía en la velocidad de producción de DHA. Por lo tanto, puede deberse a que la naturaleza del propio tampón acetato esté influyendo de manera positiva en la velocidad de producción de DHA. Por ello, y por su capacidad para amortiguar el pH, el tampón acetato va a ser utilizado en los siguientes experimentos con *resting cells*.

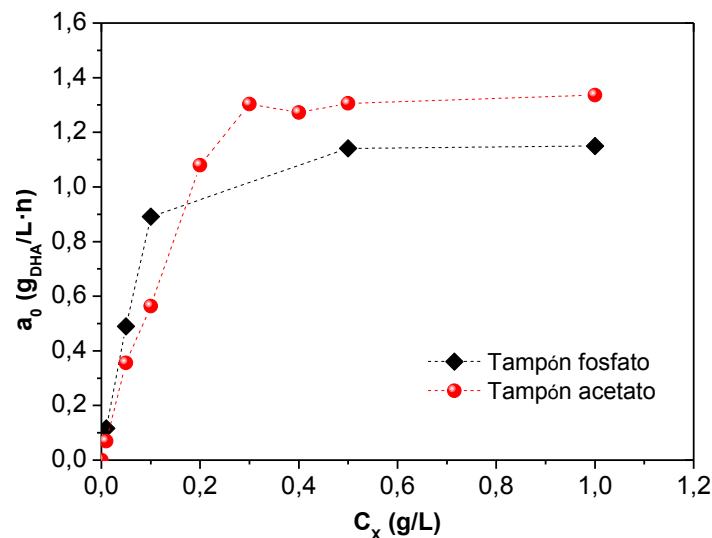


Figura 5.5. Comparación de la actividad enzimática en función de la concentración de biomasa para los experimentos realizados con tampón fosfato y acetato.

5.1.2 Estudio de la agitación y de la concentración de biomasa

En este Apartado se va a estudiar el efecto simultáneo de la agitación y de la concentración de biomasa sobre la actividad enzimática, ya que ambas variables han demostrado ser factores determinantes en el proceso. Además, se propondrá un modelo predictivo de la actividad enzimática en función de ambos factores. Para ello, se han realizado experimentos con distintas concentraciones de biomasa entre 0,01 y 1 g/L a diferentes agitaciones: 100, 200, 300 y 400 rpm. En dichos experimentos se ha empleado un medio compuesto por 25 g/L de glicerol y tampón acetato con una concentración de 20 mM, en matraz *Erlenmeyer*, a una temperatura de 30 °C. En la Tabla 5.16 se muestra el código de cada experimento, así como la concentración de biomasa empleada en cada caso y la agitación correspondiente.

Tabla 5.16. Planificación experimental para el estudio simultáneo de la influencia de la agitación y la concentración de biomasa sobre la velocidad de producción de DHA usando resting cells.

Experimento	C _x (g/L)	Agitación (rpm)
R1-100	1	100
R0,5-100	0,5	
R0,4-100	0,4	
R0,3-100	0,3	
R0,2-100	0,2	
R0,1-100	0,1	
R1-200	1	200
R0,5-200	0,5	
R0,4-200	0,4	
R0,3-200	0,3	
R0,2-200	0,2	
R0,1-200	0,1	
R0,05-200	0,05	
R0,01-200	0,01	
R1-300	1	300
R0,5-300	0,5	
R0,4-300	0,4	
R0,3-300	0,3	
R0,2-300	0,2	
R1-400	1	400
R0,5-400	0,5	
R0,4-400	0,4	
R0,2-400	0,2	
R0,1-400	0,1	

➤ Resultados experimentales

En las Tablas 5.17 a 5.32 se dan los resultados de dichos experimentos a 100, 300 y 400 rpm. Los resultados de los experimentos realizados a 200 rpm se muestran en las Tablas 5.7 a 5.14 del Apartado anterior (5.1.1).

Tabla 5.17. Resultados del experimento con resting cells R1-100.

Condiciones: 25 g/L de glicerol, tampón acetato, 30°C, 100 rpm, incubadora orbital, $C_X = 1$ g/L.

Tiempo (h)	pH	Glicerol (g/L)	DHA producida (g/L)	Ácido glicérico producido (g/L)
0	5,52	26,27	0,00	0,00
1	5,50	25,83	0,58	0,02
2	5,47	25,00	1,19	0,05
3	5,48	24,38	1,78	0,06
4	5,46	23,71	2,55	0,07
16	5,23	15,53	10,35	0,36
18	5,19	14,30	11,54	0,41
20	5,15	12,98	13,26	0,44
24	5,20	10,01	15,85	0,53
40,5	5,14	0,40	25,02	0,88
45,5	5,07	0,19	25,17	0,90

Tabla 5.18. Resultados del experimento con resting cells R0,5-100.

Condiciones: 25 g/L de glicerol, tampón acetato, 30°C, 100 rpm, incubadora orbital, $C_X = 0,5$ g/L.

Tiempo (h)	pH	Glicerol (g/L)	DHA producida (g/L)	Ácido glicérico producido (g/L)
0	5,59	25,99	0,00	0,00
1	5,50	25,62	0,61	0,01
2	5,48	24,57	1,19	0,02
3	5,49	24,11	1,85	0,03
4	5,50	23,35	2,59	0,04
16	5,29	14,96	10,81	0,22
18	5,29	13,58	12,24	0,27
20	5,24	12,03	13,66	0,30
24	5,29	9,18	16,49	0,36
40,5	5,20	0,79	24,49	0,71
45,5	5,16	0,24	24,96	0,79
48	5,09	0,17	25,12	0,81

Tabla 5.19. Resultados del experimento con resting cells R0,4-100. Condiciones: 25 g/L de glicerol, tampón acetato, 30°C, 100 rpm, incubadora orbital, $C_X = 0,4$ g/L.

Tiempo (h)	pH	Glicerol (g/L)	DHA producida (g/L)	Ácido glicérico producido (g/L)
0	5,49	26,58	0,00	0,00
1	5,48	26,04	0,54	0,00
2	5,49	25,48	1,07	0,01
3	5,49	24,77	1,78	0,02
4	5,51	24,13	2,42	0,03
16	5,36	15,93	10,46	0,19
18	5,33	13,95	12,49	0,22
20	5,29	12,92	13,31	0,36
24	5,30	10,10	16,00	0,45
40,5	5,23	0,71	25,22	0,65
45,5	5,17	0,55	25,32	0,71
48	5,12	0,57	25,17	0,74

Tabla 5.20. Resultados del experimento con resting cells R0,3-100. Condiciones: 25 g/L de glicerol, tampón acetato, 30°C, 100 rpm, incubadora orbital, $C_X = 0,3$ g/L.

Tiempo (h)	pH	Glicerol (g/L)	DHA producida (g/L)	Ácido glicérico producido (g/L)
0	5,49	26,77	0,00	0,00
1	5,50	26,22	0,57	0,00
2	5,51	25,58	1,10	0,01
3	5,50	24,87	1,72	0,02
4	5,53	24,46	2,35	0,03
16	5,36	16,04	10,42	0,30
18	5,35	14,17	12,22	0,38
20	5,33	13,21	13,16	0,40
24	5,34	10,22	16,06	0,48
40,5	5,28	1,81	24,39	0,56
45,5	5,19	1,28	24,36	0,64
48	5,11	0,83	24,80	0,65
50	5,10	0,61	24,56	0,66

Tabla 5.21. Resultados del experimento con resting cells R0,2-100. Condiciones: 25 g/L de glicerol, tampón acetato, 30°C, 100 rpm, incubadora orbital, $C_X = 0,2$ g/L.

Tiempo (h)	pH	Glicerol (g/L)	DHA producida (g/L)	Ácido glicérico producido (g/L)
0	5,49	26,73	0,00	0,00
1	5,49	26,15	0,56	0,00
2	5,51	25,37	1,04	0,01
3	5,51	24,85	1,69	0,02
4	5,53	24,46	2,23	0,03
16	5,46	16,30	9,64	0,24
18	5,38	15,07	11,09	0,30
20	5,35	13,82	12,59	0,31
24	5,37	11,32	14,95	0,44
40,5	5,27	2,94	23,19	0,46
45,5	5,10	1,92	23,33	0,50
48	5,11	1,55	23,74	0,52
50	5,10	1,17	23,81	0,53

Tabla 5.22. Resultados del experimento con resting cells R0,1-100. Condiciones: 25 g/L de glicerol, tampón acetato, 30°C, 100 rpm, incubadora orbital, $C_X = 0,1$ g/L.

Tiempo (h)	pH	Glicerol (g/L)	DHA producida (g/L)	Ácido glicérico producido (g/L)
0	5,50	27,09	0,00	0,00
1	5,50	26,71	0,50	0,00
2	5,51	26,07	1,01	0,00
3	5,52	25,23	1,62	0,01
4	5,55	24,83	2,22	0,03
16	5,38	17,12	9,72	0,24
18	5,33	15,93	10,89	0,26
20	5,20	14,12	12,66	0,30
24	5,32	12,00	14,11	0,35
40,5	5,28	4,35	20,55	0,36
45,5	5,19	2,72	22,47	0,39
48	5,17	2,07	23,04	0,44
50	5,12	1,77	23,32	0,44

Tabla 5.23. Resultados del experimento con resting cells R1-300. Condiciones: 25 g/L de glicerol, tampón acetato, 30°C, 300 rpm, incubadora orbital, $C_X = 1$ g/L.

Tiempo (h)	pH	Glicerol (g/L)	DHA producida (g/L)	Ácido glicérico producido (g/L)
0	5,56	28,05	0,00	0,00
2	5,42	22,89	4,64	0,09
4	5,28	17,80	9,90	0,35
7	5,19	10,45	17,01	0,58
14,5	4,93	0,33	24,71	0,79
17	4,90	0,33	24,61	0,81
18,5	4,89	0,28	25,22	0,84
20	4,89	0,13	25,38	0,85
22,5	4,89	0,27	25,16	0,86

Tabla 5.24. Resultados del experimento con resting cells R0,5-300. Condiciones: 25 g/L de glicerol, tampón acetato, 30°C, 300 rpm, incubadora orbital, $C_X = 0,5$ g/L.

Tiempo (h)	pH	Glicerol (g/L)	DHA producida (g/L)	Ácido glicérico producido (g/L)
0	5,54	28,28	0,00	0,00
2	5,47	23,83	4,36	0,04
4	5,36	18,99	9,11	0,18
7	5,26	12,07	15,82	0,38
14,5	5,02	1,28	24,38	0,55
17	4,96	0,59	24,50	0,58
18,5	4,91	0,55	25,27	0,58
20	4,90	0,50	25,40	0,59
22,5	4,89	0,32	25,78	0,60

Tabla 5.25. Resultados del experimento con resting cells R0,4-300. Condiciones: 25 g/L de glicerol, tampón acetato, 30°C, 300 rpm, incubadora orbital, $C_X = 0,4$ g/L.

Tiempo (h)	pH	Glicerol (g/L)	DHA producida (g/L)	Ácido glicérico producido (g/L)
0	5,54	28,37	0,00	0,00
2	5,46	24,13	4,19	0,04
4	5,39	19,59	8,49	0,15
7	5,30	13,26	14,84	0,27
14,5	5,07	2,78	23,04	0,44
17	5,02	1,17	24,85	0,48
18,5	5,01	0,74	25,42	0,52
20	4,99	0,48	25,63	0,53
22,5	4,98	0,45	25,71	0,53

Tabla 5.26. Resultados del experimento con resting cells R0,3-300. Condiciones: 25 g/L de glicerol, tampón acetato, 30°C, 300 rpm, incubadora orbital, $C_X = 0,3$ g/L.

Tiempo (h)	pH	Glicerol (g/L)	DHA producida (g/L)	Ácido glicérico producido (g/L)
0	5,53	27,86	0,00	0,00
2	5,47	24,27	3,57	0,03
4	5,42	20,28	7,46	0,10
7	5,35	14,68	12,95	0,22
14,5	5,13	4,60	20,87	0,33
17	5,14	2,48	23,15	0,38
18,5	5,07	1,68	23,99	0,39
20	5,06	1,12	24,48	0,41
22,5	5,06	0,83	24,69	0,42

Tabla 5.27. Resultados del experimento con resting cells R0,2-300. Condiciones: 25 g/L de glicerol, tampón acetato, 30°C, 300 rpm, incubadora orbital, $C_X = 0,2$ g/L.

Tiempo (h)	pH	Glicerol (g/L)	DHA producida (g/L)	Ácido glicérico producido (g/L)
0	5,52	29,06	0,00	0,00
2	5,49	26,14	2,60	0,03
4	5,46	23,68	5,28	0,07
7	5,39	19,70	9,24	0,10
14,5	5,23	10,30	16,05	0,21
17	5,21	8,12	18,08	0,27
18,5	5,19	6,98	19,93	0,30
20	5,16	5,60	21,05	0,32
22,5	5,13	3,89	22,69	0,33

Tabla 5.28. Resultados del experimento con resting cells R1-400. Condiciones: 25 g/L de glicerol, tampón acetato, 30°C, 400 rpm, incubadora orbital, $C_X = 1$ g/L.

Tiempo (h)	pH	Glicerol (g/L)	DHA producida (g/L)	Ácido glicérico producido (g/L)
0	5,42	26,02	0,00	0,00
1	5,38	22,25	3,46	0,03
2	5,32	18,47	7,32	0,10
4	5,25	9,94	14,30	0,24
6	5,19	3,91	20,30	0,38
8	5,13	0,95	23,37	0,47
10	5,07	0,57	23,85	0,52
12	5,03	0,47	23,73	0,53

Tabla 5.29. Resultados del experimento con resting cells R0,5-400. Condiciones: 25 g/L de glicerol, tampón acetato, 30°C, 400 rpm, incubadora orbital, $C_X = 0,5$ g/L.

Tiempo (h)	pH	Glicerol (g/L)	DHA producida (g/L)	Ácido glicérico producido (g/L)
0	5,43	28,00	0,00	0,00
1	5,41	25,06	2,91	0,02
2	5,38	21,63	6,10	0,06
4	5,29	14,10	12,40	0,16
6	5,23	9,18	17,13	0,22
8	5,16	4,86	21,67	0,32
10	5,09	1,90	24,26	0,36
12	5,05	1,08	24,97	0,38

Tabla 5.30. Resultados del experimento con resting cells R0,4-400. Condiciones: 25 g/L de glicerol, tampón acetato, 30°C, 400 rpm, incubadora orbital, $C_X = 0,4$ g/L.

Tiempo (h)	pH	Glicerol (g/L)	DHA producida (g/L)	Ácido glicérico producido (g/L)
0	5,39	26,54	0,00	0,00
1	5,36	23,57	2,70	0,01
2	5,33	20,23	5,81	0,04
4	5,26	14,33	11,55	0,12
6	5,19	9,26	15,59	0,15
8	5,13	5,08	19,99	0,26
10	5,11	2,36	22,48	0,29
12	5,08	1,32	23,35	0,30
14	5,07	0,73	25,25	0,36

Tabla 5.31. Resultados del experimento con resting cells R0,2-400. Condiciones: 25 g/L de glicerol, tampón acetato, 30°C, 400 rpm, incubadora orbital, $C_X = 0,2$ g/L.

Tiempo (h)	pH	Glicerol (g/L)	DHA producida (g/L)	Ácido glicérico producido (g/L)
0	5,46	26,52	0,00	0,00
1	5,44	25,05	1,46	0,00
2	5,41	23,37	3,13	0,01
4	5,37	19,36	6,72	0,03
6	5,34	15,92	9,35	0,06
8	5,30	12,96	12,35	0,10
10	5,26	10,15	15,15	0,13
12	5,22	7,70	17,38	0,15
14	5,19	5,65	19,98	0,24

Tabla 5.32. Resultados del experimento con resting cells R0,1-400. Condiciones: 25 g/L de glicerol, tampón acetato, 30°C, 400 rpm, incubadora orbital, $C_X = 0,1$ g/L.

Tiempo (h)	pH	Glicerol (g/L)	DHA producida (g/L)	Ácido glicérico producido (g/L)
0	5,47	26,32	0,00	0,00
1	5,45	25,69	0,74	0,00
2	5,43	25,31	1,79	0,00
4	5,40	21,62	3,48	0,00
6	5,37	19,69	5,34	0,01
8	5,34	17,68	7,47	0,04
10	5,31	15,97	9,51	0,07
12	5,26	14,53	10,62	0,10
14	5,21	12,95	12,18	0,13

➤ **Discusión de los resultados**

En las Figuras 5.6, 5.7, 5.8 y 5.9 se han representado los resultados obtenidos con diferentes concentraciones de biomasa en estado de *resting cells* a 100, 200, 300 y 400 rpm, respectivamente. En el primer caso, no se observan diferencias significativas ni en la evolución del glicerol con el tiempo, ni en la producción de DHA, a pesar de que la concentración de biomasa se haya incrementado de 0,01 a 1 g/L en los distintos experimentos. Sin embargo, se aprecian ligeras diferencias en la producción de ácido glicérico (Figura 5.6 (c)), de modo que a mayor concentración de biomasa, mayor producción de ácido glicérico, ya que la limitación por oxígeno no afecta a la producción de este subproducto, como se ha comentado en Apartados anteriores. Al aumentar la agitación a 200 rpm (Figura 5.7), comienzan a aparecer diferencias en la velocidad de consumo de glicerol y de producción de DHA para concentraciones bajas de biomasa (0,01-0,2 g/L), indicando que en estos casos el oxígeno deja de ser un factor limitante. No obstante, las curvas de consumo de glicerol y de producción de DHA se solapan en los distintos experimentos al aumentar la concentración de biomasa, revelando que el oxígeno aportado con esta agitación es insuficiente para todas las células. Algo similar ocurre a 300 rpm (Figura 5.8); no se observan grandes diferencias en los experimentos con más de 0,2 g/L de biomasa, excepto en la producción de ácido glicérico, que, como ya se ha citado, guarda una relación directa con la cantidad de biomasa presente.

En los experimentos realizados a 400 rpm (Figura 5.9) deja de haber diferencias a partir de 0,4 g/L de biomasa. Pese a ello, comparando los experimentos con mayor concentración de biomasa (1 g/L) a distintas agitaciones, se observa que el tiempo necesario para llevar a cabo la biotransformación se reduce de 40 a 10 horas cuando la agitación se incrementa de 100 a 400 rpm, tal y como muestran las Figuras 5.6 (a) y 5.9 (a). Es decir, la productividad se incrementa casi 4 veces, lo que pone de manifiesto la importancia de la relación entre aireación y concentración de biomasa en este proceso. Además, cabe destacar que la producción máxima de ácido glicérico es menor a 400 rpm (0,53 g/L) que a agitaciones menores (alrededor de 0,9 g/L).

Por otro lado, se constata la eficacia del tampón acetato para mantener el pH en torno a 5 en todos los casos, tal y como se puede apreciar en las Figuras 5.6 (d), 5.7 (d), 5.8 (d) y 5.9 (d).

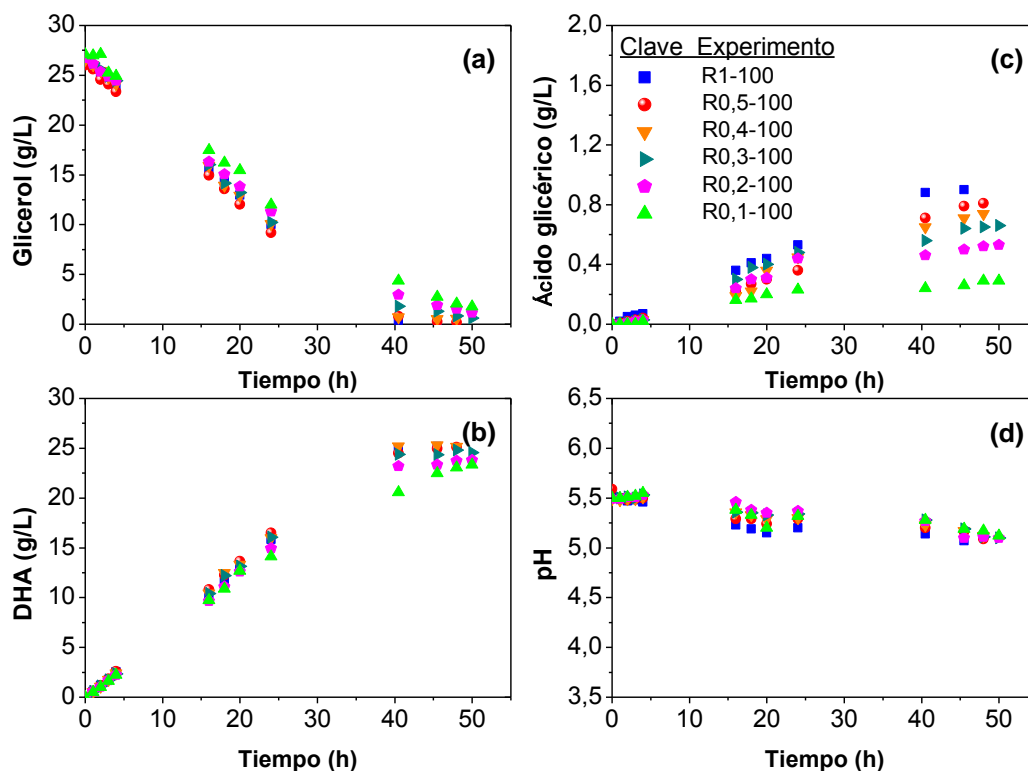


Figura 5.6. Evolución con el tiempo del glicerol (a); la DHA (b); el ácido glicérico (c) y el pH (d) para los experimentos realizados con distintas concentraciones de resting cells a 100 rpm.

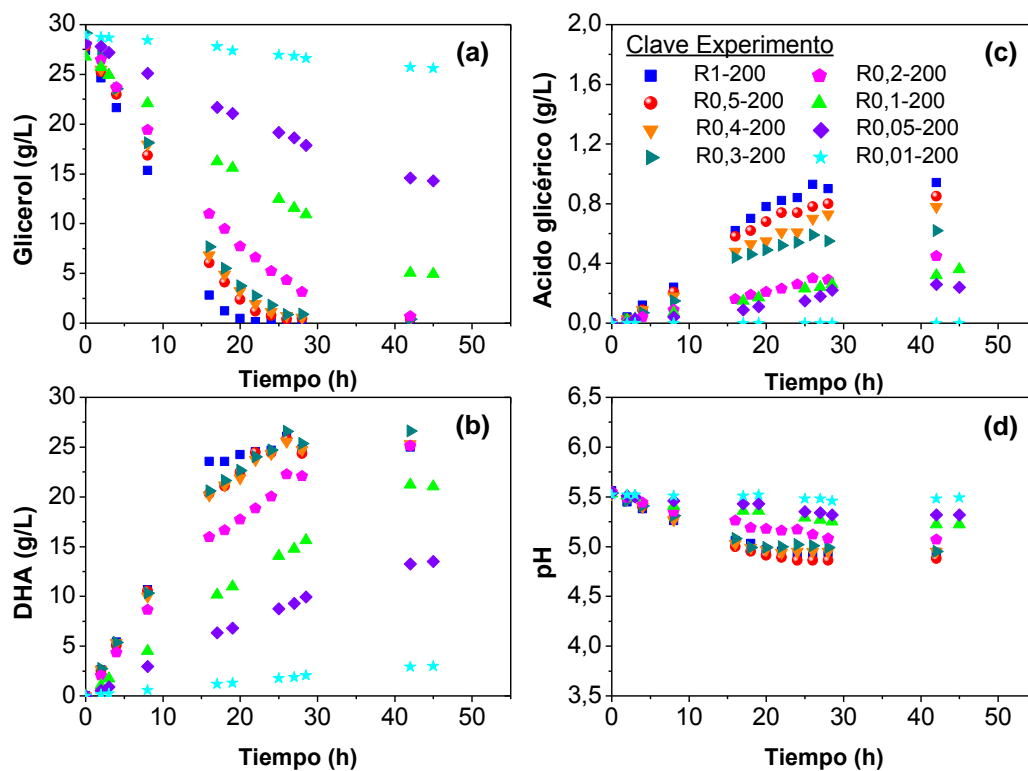


Figura 5.7. Evolución con el tiempo del glicerol (a); la DHA (b); el ácido glicérico (c) y el pH (d) para los experimentos realizados con distintas concentraciones de resting cells a 200 rpm.

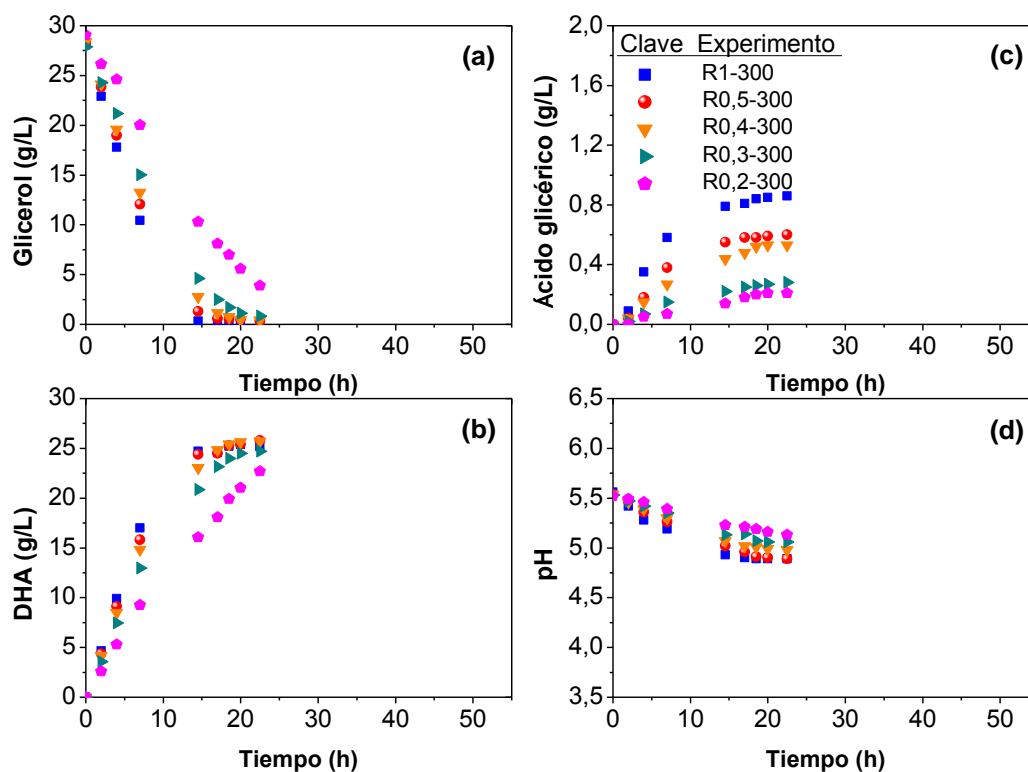


Figura 5.8. Evolución con el tiempo del glicerol (a); la DHA (b); el ácido glicérico (c) y el pH (d) para los experimentos realizados con distintas concentraciones de resting cells a 300 rpm.

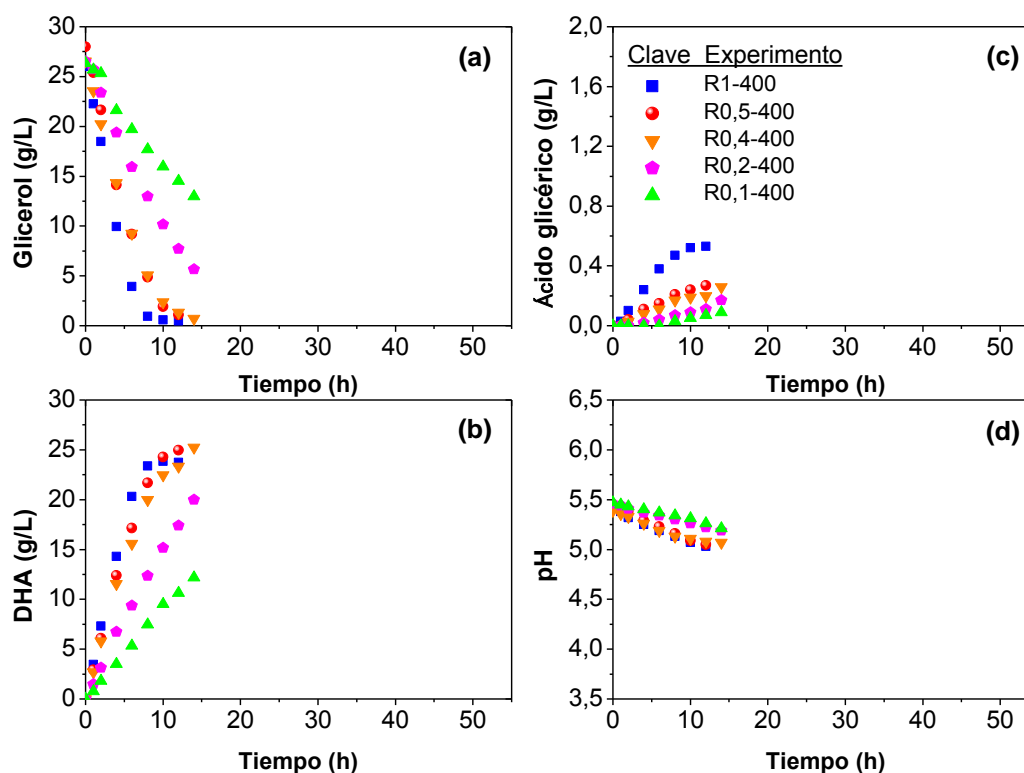


Figura 5.9. Evolución con el tiempo del glicerol (a); la DHA (b); el ácido glicérico (c) y el pH (d) para los experimentos realizados con distintas concentraciones de resting cells a 400 rpm.

Para profundizar en este estudio, se ha calculado la actividad enzimática en cada uno de los experimentos como la velocidad inicial de producción de DHA, obtenida a partir de la pendiente de la curva de concentración de DHA frente al tiempo. Se trata de establecer una relación entre actividad enzimática, concentración de biomasa y aireación, expresada como coeficiente volumétrico de transporte de oxígeno (k_{La}), y describir este fenómeno mediante un modelo matemático. En la Figura 5.10 se muestran los ajustes realizados para los experimentos llevados a cabo con diferentes concentraciones de *resting cells* a 100 rpm (a); 200 rpm (b); 300 rpm (c) y 400 rpm (d). Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 5.33, en la que se muestran los valores de k_{La} empleados en cada experimento, calculados en función de la agitación según la ecuación [4.1].

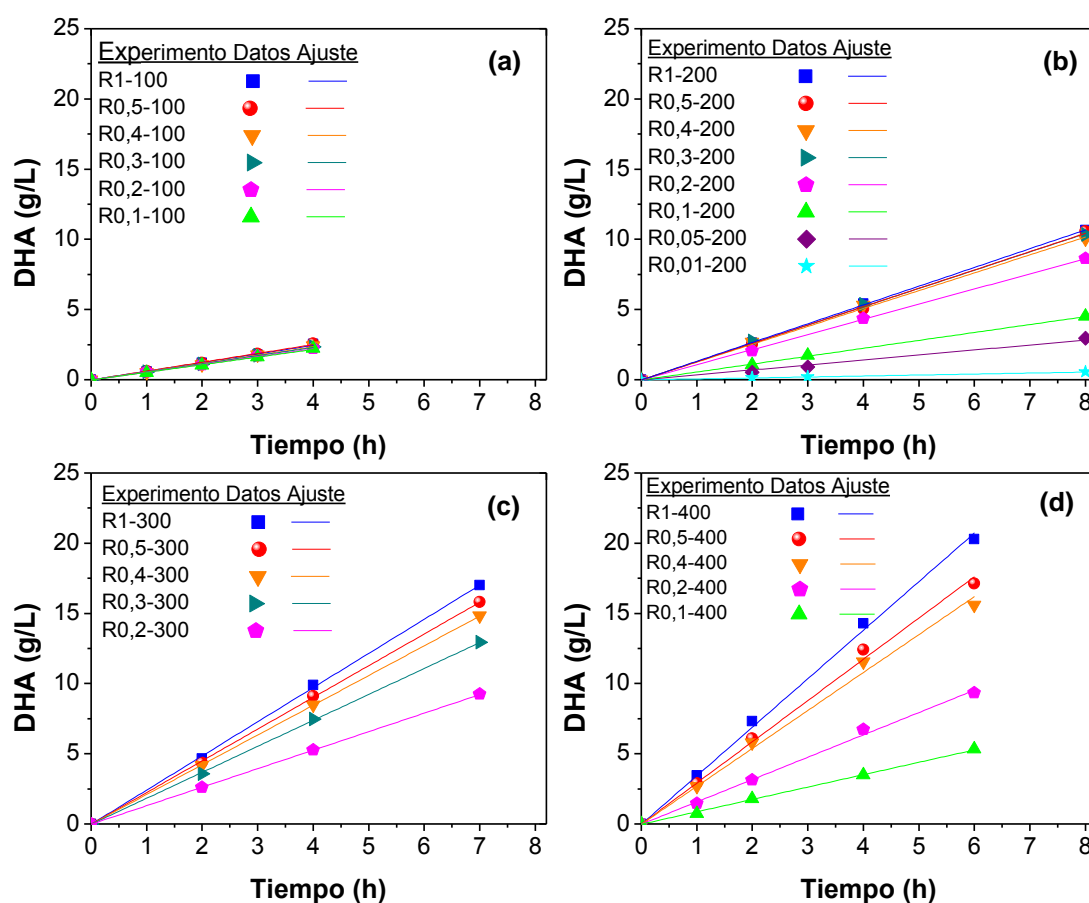


Figura 5.10. Representación de los ajustes lineales de los datos de concentración de DHA frente al tiempo para el cálculo de la actividad enzimática de los experimentos llevados a cabo con distintas concentraciones de resting cells a diferentes agitaciones: 100 rpm (a); 200 rpm (b); 300rpm (c) y 400 rpm (d).

Tabla 5.33. Valores de actividad enzimática (a_0) de los experimentos realizados con distintas concentraciones de resting cells y a diferentes agitaciones.

Experimento	C_X (g/L)	Agitación (rpm)	$k_L a$ (s^{-1})	a_0 ($g_{DHA}/L \cdot h$)	r^2
R1-100	1	100	0,0073	0,62	0,998
R0,5-100	0,5			0,63	0,998
R0,4-100	0,4			0,59	0,998
R0,3-100	0,3			0,58	0,999
R0,2-100	0,2			0,55	0,999
R0,1-100	0,1			0,54	0,999
R1-200	1	200	0,0135	1,34	0,999
R0,5-200	0,5			1,31	0,999
R0,4-200	0,4			1,27	0,999
R0,3-200	0,3			1,30	0,999
R0,2-200	0,2			1,08	0,999
R0,1-200	0,1			0,56	0,999
R0,05-200	0,05			0,36	0,990
R0,01-200	0,01			0,07	0,997
R1-300	1	300	0,0193	2,43	0,999
R0,5-300	0,5			2,26	0,999
R0,4-300	0,4			2,12	0,999
R0,3-300	0,3			1,85	0,999
R0,2-300	0,2			1,32	0,999
R1-400	1	400	0,0248	3,46	0,999
R0,5-400	0,5			2,94	0,998
R0,4-400	0,4			2,70	0,997
R0,2-400	0,2			1,59	0,998
R0,1-400	0,1			0,88	0,999

En la Figura 5.11 se puede observar la evolución de la actividad enzimática en función de la concentración de biomasa para cada uno de los experimentos realizados a distintas agitaciones. En todos los casos, los datos experimentales siguen una evolución de tipo hiperbólico. Dado que la producción de DHA con *resting cells* puede asemejarse a un proceso enzimático, ya que la biotransformación se lleva a cabo a través de la enzima glicerol deshidrogenasa situada en la membrana citoplasmática (Deppenmeier y col., 2002), tiene sentido formular un modelo matemático similar al de Michaelis-Menten. Sin embargo, el modelo anterior predice una velocidad de reacción dependiente de la concentración de sustrato y en este proceso se ha comprobado en matraz

Erlenmeyer que la concentración inicial de glicerol no influye en la velocidad de producción (Apartado 3.3.2). No obstante, la velocidad inicial de producción de DHA o actividad enzimática, depende fundamentalmente de la concentración de biomasa y la agitación; por ello, se ha modificado el modelo de Michaelis-Menten sustituyendo la concentración de sustrato por la concentración de biomasa, según la ecuación [5.3].

$$a_0 \left(\frac{\text{g}_{DHA}}{\text{L}\cdot\text{h}} \right) = \frac{a_0^{\max} \cdot C_X}{C_X + km} \quad [5.3]$$

Ajustando la ecuación [5.3] a los datos experimentales, se obtienen los parámetros que se recogen en la Tabla 5.34 para cada agitación. La predicción es bastante buena, como se puede deducir de las curvas de ajuste mostradas en la Figura 5.11.

Tabla 5.34. Parámetros cinéticos obtenidos al ajustar la ecuación [5.3] a los datos experimentales a_0 vs C_X para cada agitación.

Agitación (rpm)	$k_L a$ (s^{-1})	a_0^{\max} ($\text{g}_{DHA}/\text{L}\cdot\text{h}$)	km (g/L)	r^2
100	0,0073	$0,626 \pm 0,013$	$0,018 \pm 0,005$	0,994
200	0,0135	$1,669 \pm 0,135$	$0,139 \pm 0,037$	0,963
300	0,0193	$3,086 \pm 0,259$	$0,214 \pm 0,054$	0,980
400	0,0248	$4,957 \pm 0,429$	$0,383 \pm 0,076$	0,987

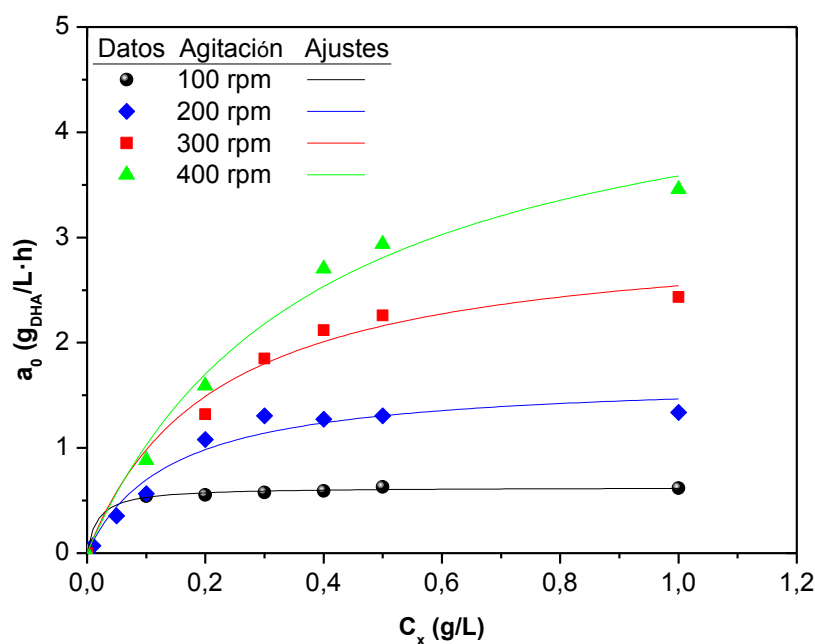


Figura 5.11. Efecto de la concentración de biomasa sobre la actividad enzimática de *G. oxydans* (a_0) para cada una de las agitaciones ensayadas.

Sin embargo, la ecuación [5.3] únicamente depende de la concentración de biomasa y no tiene en cuenta el efecto de la aireación de manera explícita, aunque en los valores de los parámetros obtenidos tras el ajuste se puede observar una influencia clara de la aireación, dado que ambos aumentan con $k_L a$ (Tabla 5.34). Con el objetivo de obtener una ecuación en la que se reflejen las dos influencias y que sea capaz de describir el comportamiento de todos los experimentos simultáneamente, se ha representado el parámetro a_0^{\max} en función de $k_L a$ observándose una tendencia que puede ser descrita de manera satisfactoria a través de la ecuación [5.4]. En la Figura 5.12 se muestra el ajuste realizado y en la Tabla 5.35 se recogen los parámetros obtenidos.

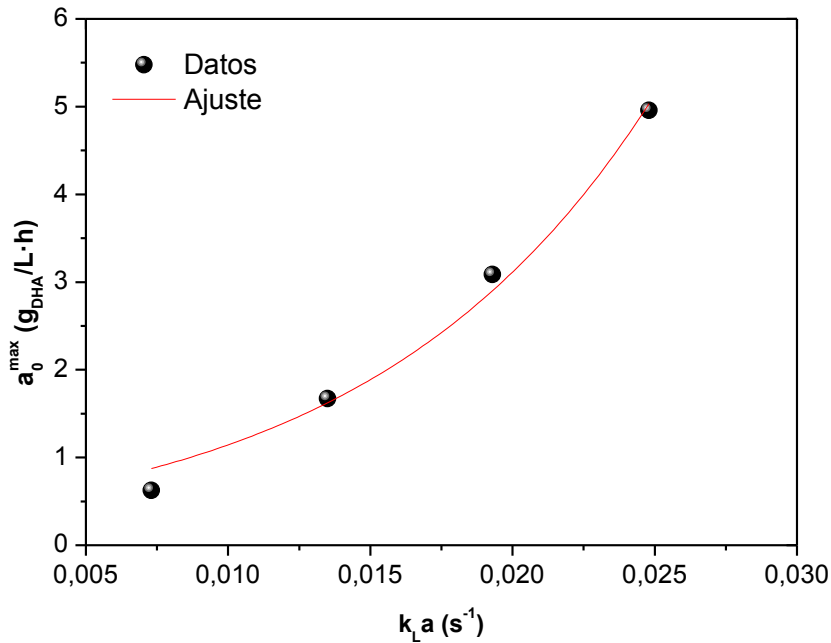


Figura 5.12. Relación entre el parámetro a_0^{\max} y $k_L a$. Los puntos negros representan los valores experimentales y la línea roja el ajuste de los datos a la ecuación [5.4].

$$a_0^{\max} \left(\frac{g_{DHA}}{L \cdot h} \right) = A \cdot \exp(R_0 \cdot k_L a) \quad [5.4]$$

Tabla 5.35. Parámetros cinéticos obtenidos al ajustar la ecuación [5.4] a los datos de a_0^{\max} en función de $k_L a$.

Parámetro	Valor	r^2
A (g/L·h)	$0,42 \pm 0,09$	0,985
R_0 (s)	$100,13 \pm 9,10$	

Sustituyendo la expresión que vincula el parámetro a_0^{\max} con $k_L a$ (ecuación [5.4]) en la ecuación [5.3], se obtiene un modelo que relaciona directamente la actividad enzimática con la concentración de biomasa y el coeficiente volumétrico de transporte de oxígeno ($k_L a$), de acuerdo con la ecuación [5.5]. Este modelo es válido para $k_L a > 0$, dado que se trata de una bacteria aerobia estricta y no tendría sentido tratar de simular su comportamiento en condiciones de anaerobiosis ($k_L a = 0$).

$$a_0 \left(\frac{g_{DHA}}{L \cdot h} \right) = \frac{A \cdot \exp(R_0 \cdot k_L a) \cdot C_X}{C_X + Km} \quad [5.5]$$

Ajustando la ecuación [5.5] a los datos experimentales, se obtienen los parámetros que se recogen en la Tabla 5.36.

Tabla 5.36. *Parámetros cinéticos obtenidos al ajustar la ecuación [5.5] a todos los experimentos de manera simultánea.*

Parámetro	Valor	r^2
A (g/L·h)	0,75 ± 0,10	0,948
R_0 (s)	71,73 ± 5,30	
Km (g/L)	0,26 ± 0,05	

Por otro lado, en la Figura 5.13 se han representado los datos experimentales junto con los valores predichos por el modelo y se observa que las predicciones del modelo representan bien la tendencia de los datos. Sin embargo, para cuantificar las desviaciones del modelo, en la Figura 5.14 se han representado los valores predichos frente a los valores experimentales de actividad enzimática, así como la bisectriz, que indica las predicciones sin error, y unas líneas acotando una desviación de $\pm 10\%$, considerada como razonable. En la mayoría de los casos, los puntos se distribuyen alrededor de la bisectriz y apenas superan el 10% de error. No obstante, la simulación presenta desviaciones mayores del 10% para algunos de los puntos, pero teniendo en cuenta que el ajuste se ha realizado con un número de experimentos elevado, el modelo puede considerarse válido.

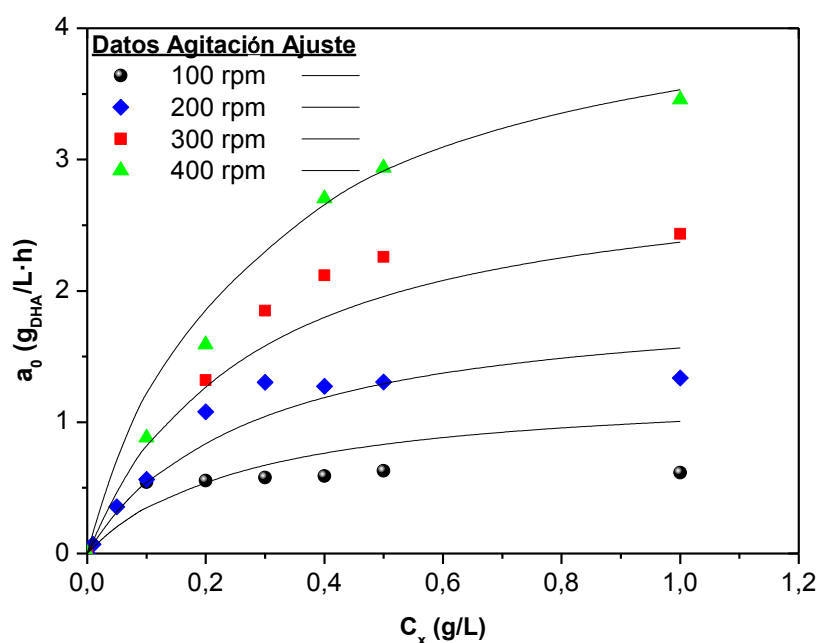


Figura 5.13. Ajuste simultáneo de la ecuación [5.5] a todos los experimentos en función de la concentración de biomasa y k_La (línea negra).

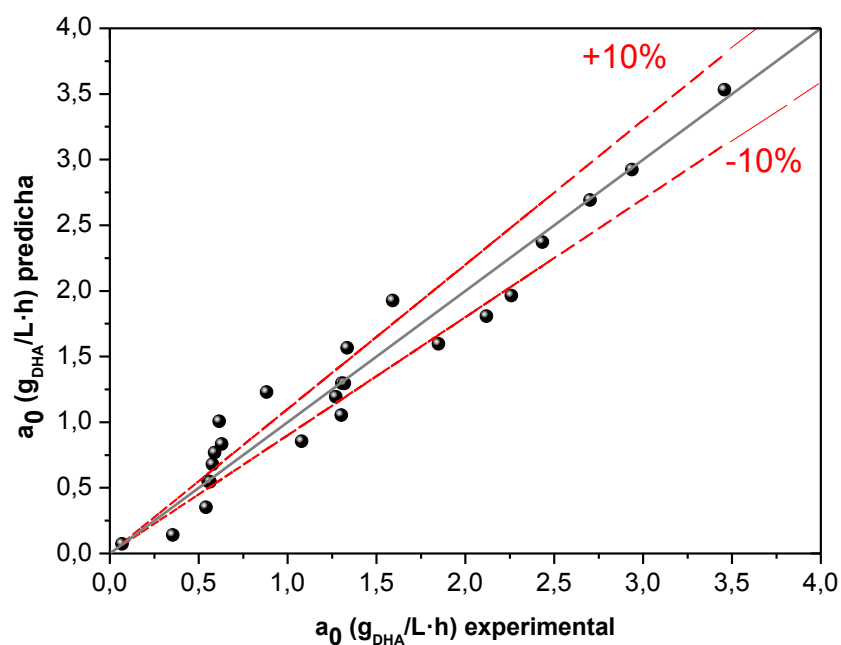


Figura 5.14. Representación de los valores de actividad enzimática predichos por el modelo frente a los valores experimentales. La bisectriz indica las predicciones sin error y las líneas rojas muestran una desviación de $\pm 10\%$ respecto a los valores experimentales.

5.2 ESTUDIOS EN BIORREACTOR STBR

La hipótesis de que el escaso aporte de oxígeno por célula pueda ser la causa de que la velocidad de producción de DHA no sea proporcional a la cantidad de biomasa presente en el caldo se ha estado considerando desde que en el Apartado 4.3 se identificara la agitación como un factor clave en el desarrollo de este proceso. Sin embargo, aunque en el Apartado 5.1.2 se ha podido modelizar este fenómeno en función de k_{La} , no ha sido posible la realización de un estudio más exhaustivo sobre el aporte y el consumo de oxígeno, debido a la dificultad de medir la concentración de oxígeno en el líquido en matraces de tipo *Erlenmeyer*. Por este motivo, resulta imprescindible ampliar el estudio en reactores tipo tanque agitado (STBR), ya que permiten la monitorización tanto de la concentración del oxígeno disuelto en el caldo, como del oxígeno de la corriente gaseosa de salida, para poder llevar a cabo un estudio del transporte y consumo de oxígeno.

Debido a la baja solubilidad del oxígeno en disoluciones acuosas, en torno a 10 ppm a temperatura ambiente, este nutriente debe ser suministrado de manera continua al caldo de cultivo para satisfacer la demanda de las células, que metabolizan únicamente el oxígeno disuelto (Doran, 2013). En el caso de los biorreactores STBR, el suministro de oxígeno se realiza a través de un difusor de aire situado en la parte inferior del recipiente y un sistema de agitación mecánica que asegura la dispersión del gas en el líquido de manera homogénea. No obstante, al tratarse de un sistema trifásico, compuesto por una fase gas (el aire), una fase líquida (el medio de cultivo) y una fase sólida (el microorganismo), el oxígeno debe vencer una batería de resistencias en serie relacionadas con el transporte tanto en el seno de las distintas fases (gas-líquido-sólido), como en cada una de las interfases (gas-líquido y líquido-sólido) hasta llegar a la célula. Considerando que el transporte de oxígeno en la fase gas es relativamente rápido y que el buen grado de mezcla proporcionado por el sistema de agitación mecánica minimiza los gradientes de concentración en el líquido y, por tanto, la resistencia a la transferencia de materia en esta región, el problema del transporte de oxígeno se reduce a la transferencia de materia en la interfase gas-líquido (Van't Riet, 1983). En este sentido, el tipo de agitador empleado juega un papel esencial ya que no sólo ayuda a dispersar el gas en el líquido, sino que también favorece el contacto entre las fases rompiendo las burbujas e incrementando de este modo el área superficial de las mismas y, con ello, la velocidad de transferencia de oxígeno del gas al líquido (Martín y col., 2008; Karimi y

col., 2013). Asimismo, la velocidad de agitación, el caudal de aire y el empleo de aire enriquecido u oxígeno puro también influyen decisivamente en la velocidad de transferencia de oxígeno al líquido.

El seguimiento de la evolución de la concentración de oxígeno disuelto en el caldo con el tiempo aporta información sobre el estado del cultivo, pues es el resultado del balance entre la velocidad a la que se transporta el oxígeno del gas al líquido (*oxygen transfer rate*, OTR) y la velocidad de consumo de oxígeno por parte de las células (*oxygen uptake rate*, OUR), según muestra la ecuación [5.6].

$$\frac{dC_{O_2}}{dt} = OTR - OUR \quad [5.6]$$

La velocidad de transporte de oxígeno (OTR) se define según la ecuación:

$$OTR = k_L a \cdot (C_{O_2}^* - C_{O_2}) \quad [5.7]$$

donde $C_{O_2}^*$ representa la concentración de saturación de oxígeno en el líquido, que depende fundamentalmente de la temperatura y la presión y C_{O_2} representa la concentración de oxígeno disuelto en el líquido en cada momento, que depende de la velocidad de consumo del microorganismo, siendo la diferencia entre ambas concentraciones la fuerza impulsora que permite que se produzca la transferencia de oxígeno del gas al líquido. Por su parte, $k_L a$ es el coeficiente volumétrico de transporte de oxígeno, definido en Apartados previos, cuyo valor es función de las propiedades físicas del líquido y del gas, de las condiciones de operación y de los parámetros geométricos del biorreactor (García-Ochoa y Gómez, 2009).

Por otro lado, la velocidad de consumo de oxígeno (OUR) se puede expresar mediante la siguiente ecuación:

$$OUR = q_{O_2} \cdot C_X \quad [5.8]$$

siendo q_{O_2} la velocidad específica de consumo de oxígeno y C_X la concentración de biomasa. Este parámetro da una idea de la actividad del cultivo, siendo un buen indicativo del estrés global o daño celular generado por las condiciones hidrodinámicas en el biorreactor, como así se ha demostrado en varios estudios (García-Ochoa y col.,

2011; García-Ochoa y col., 2015). Por ello, dicho parámetro resulta muy útil para establecer las condiciones hidrodinámicas óptimas en un bioproceso.

Dado que los procesos de transporte y consumo de oxígeno están acoplados en serie, el valor de OUR puede verse afectado si OTR constituye la etapa más lenta o limitante y, con ello, provocar una disminución en la velocidad global del proceso (García-Ochoa y col., 2015). En tal caso, si el valor de OUR es mayor que OTR, la concentración de oxígeno disuelto en el caldo disminuirá con el tiempo según la ecuación [5.6]. Si dicha concentración cae por debajo de un cierto valor crítico ($C_{O_2}^{Crít}$), entonces la velocidad global del proceso se verá limitada por un suministro inadecuado de oxígeno. Por tanto, para evitar dicha limitación, es imprescindible que $C_{O_2} > C_{O_2}^{Crít}$ (Torres y col., 2008).

El objetivo de este Apartado es, por tanto, esclarecer el papel del oxígeno en la producción de DHA y determinar qué condiciones hidrodinámicas son las más adecuadas. Para ello, se han planteado una serie de experimentos en biorreactor STBR de 2 L de capacidad (1 L de volumen de trabajo), provisto de un agitador de turbina *Rushton*, ampliamente utilizado para la dispersión de gas en fluidos poco viscosos (Ulbrecht y Patterson, 1985), con una concentración prefijada de células en estado de *resting cells*. En dichos experimentos se ha variado el aporte de oxígeno al medio cambiando la velocidad de agitación (Tabla 5.37). Se ha descartado el empleo de aire enriquecido u oxígeno puro porque supondría un encarecimiento evidente del proceso y estas técnicas no han reportado buenos resultados en bibliografía (Oosterhuis y col., 1985). Asimismo, se ha decidido trabajar con un caudal de aire constante (1 vvm) porque su influencia sobre k_La es mucho menor que la que ejerce la agitación (García-Ochoa y Gómez, 2004).

Tabla 5.37. Planificación experimental para el estudio de la influencia del oxígeno disuelto en la producción de DHA en biorreactor empleando un medio compuesto por 25 g/L de glicerol, tampón acetato y una concentración de 0,5 g/L de biomasa en estado de resting cells.

Experimento	Agitación (rpm)
B-300	300
B-360	360
B-420	420
B-560	560
B-650	650
B-750	750
B-900	900

➤ Resultados experimentales

En las Tablas 5.38 a 5.44 se exponen los resultados correspondientes a la evolución con el tiempo del pH, de las concentraciones de biomasa, glicerol, DHA y ácido glicérico para los experimentos de la Tabla 5.37. Además, en las tablas correspondientes a los experimentos B-360, B-650, B-750 y B-900 se recogen también los resultados obtenidos tras realizar un conteo del número de viables en placa (UFC) con el tiempo para comprobar el efecto de las distintas condiciones hidrodinámicas sobre la viabilidad celular.

Por otro lado, en la Tabla 5.45 se muestran los datos de la evolución del oxígeno disuelto con el tiempo (C_{O_2}), medidos por el electrodo de membrana sumergido en el caldo, así como los datos relativos al porcentaje de oxígeno contenido en la corriente gaseosa de salida del biorreactor (x_{O_2}), recogidos por el medidor de gases, para cada experimento. Dichos datos son el punto de partida para el cálculo de OTR, k_{La} , OUR y q_{O_2} siguiendo la metodología de cálculo expuesta en el Apartado 2.5.2 del Capítulo de Materiales y Métodos. Los valores calculados de los parámetros anteriores se muestran en las Tablas 5.46 y 5.47. Cabe señalar que en aquellos experimentos en los que no fue posible medir la composición de la corriente gaseosa de salida del biorreactor (B-360, B-650 y B-750) k_{La} se ha estimado siguiendo el método predictivo propuesto por García-Ochoa y Gómez (2004) y explicado en detalle en el Apartado 2.5.1.

Tabla 5.38. Resultados del experimento B-300 en resting cells llevado a cabo en biorreactor de 1L. Condiciones: 25 g/L de glicerol, tampón acetato 20 mM, 30°C, 300 rpm, caudal de aireación: 1 vvm y $C_X = 0,5$ g/L.

Tiempo (h)	Biomasa (g/L)	pH	Glicerol (g/L)	DHA producida (g/L)	Ácido glicérico producido (g/L)
0	0,55	5,45	26,68	0,00	0,00
1	0,53	5,43	25,89	0,72	0,04
2	0,51	5,40	24,31	1,30	0,09
4	0,49	5,35	23,51	2,73	0,15
6	0,50	5,27	21,45	4,12	0,24
20	0,43	4,85	10,36	14,66	0,63
22	0,44	4,81	8,59	16,44	0,69
24	0,43	4,78	7,13	17,85	0,74
44	0,46	4,66	0,36	25,50	0,86

Tabla 5.39. Resultados del experimento B-360 en resting cells llevado a cabo en biorreactor de 1L. Condiciones: 25 g/L de glicerol, tampón acetato 20 mM, 30°C, 360 rpm, caudal de aireación: 1 vvm y $C_X = 0,5$ g/L.

Tiempo (h)	Biomasa (g/L)	pH	Viables (ufc/mL)	Glicerol (g/L)	DHA producida (g/L)	Ácido glicérico producido (g/L)
0	0,47	5,50	2,35E+06	27,35	0,00	0,00
2	0,38	5,44		23,95	3,09	0,04
4	0,38	5,37	5,00E+05	20,06	6,35	0,10
6	0,35	5,32		17,59	9,11	0,17
8	0,33	5,28	8,45E+04	14,42	12,34	0,25
19	0,29	5,16	9,00E+03	3,87	21,68	0,53
23	0,32	5,15		1,47	22,97	0,65
26	0,31	5,13		0,75	23,83	0,75

Tabla 5.40. Resultados del experimento B-420 en resting cells llevado a cabo en biorreactor de 1L. Condiciones: 25 g/L de glicerol, tampón acetato 20 mM, 30°C, 420 rpm, caudal de aireación: 1 vvm y $C_X = 0,5$ g/L.

Tiempo (h)	Biomasa (g/L)	pH	Glicerol (g/L)	DHA producida (g/L)	Ácido glicérico producido (g/L)
0	0,55	5,57	27,68	0,00	0,00
1	0,48	5,53	25,15	2,16	0,05
2	0,46	5,49	22,32	3,89	0,07
4	0,45	5,41	16,80	7,03	0,12
7,2	0,42	5,39	10,78	14,23	0,21
16,5	0,40	5,11	1,66	23,14	0,40
18	0,42	5,10	1,01	24,01	0,45
20	0,43	5,09	0,68	24,25	0,49
21,5	0,44	5,08	0,69	24,37	0,53
26	0,46	5,07	0,52	24,62	0,60
41,5	0,45	4,99	0,11	25,75	0,66

Tabla 5.41. Resultados del experimento B-560 en resting cells llevado a cabo en biorreactor de 1L. Condiciones: 25 g/L de glicerol, tampón acetato 20 mM, 30°C, 560 rpm, caudal de aireación: 1 vvm y $C_X = 0,5$ g/L.

Tiempo (h)	Biomasa (g/L)	pH	Glicerol (g/L)	DHA producida (g/L)	Ácido glicérico producido (g/L)
0	0,47	5,41	30,20	0,00	0,00
1	0,42	5,39	26,35	2,90	0,06
2	0,42	5,35	21,87	5,46	0,09
4	0,37	5,29	16,44	10,03	0,11
6	0,33	5,21	11,39	13,85	0,20
8	0,38	5,15	7,93	18,38	0,26
10	0,36	5,11	4,95	20,02	0,29
12	0,35	5,09	3,02	21,37	0,33
24	0,31	5,04	0,42	23,39	0,48

Tabla 5.42. Resultados del experimento B-650 en resting cells llevado a cabo en biorreactor de 1L. Condiciones: 25 g/L de glicerol, tampón acetato 20 mM, 30°C, 650 rpm, caudal de aireación: 1 vvm y $C_X = 0,5$ g/L.

Tiempo (h)	Biomasa (g/L)	pH	Viables (UFC/mL)	Glicerol (g/L)	DHA producida (g/L)	Ácido glicérico producido (g/L)
0	0,53	5,27	2,40E+05	26,15	0,00	0,00
2	0,51	5,21		20,32	6,03	0,04
4	0,49	5,13	2,20E+05	14,48	11,01	0,13
6	0,47	5,06		9,64	15,21	0,20
8	0,44	5,01	6,00E+04	6,42	17,84	0,25
10	0,48	4,98		3,98	19,28	0,28
21	0,47	4,90	4,50E+02	0,38	22,85	0,36

Tabla 5.43. Resultados del experimento B-750 en resting cells llevado a cabo en biorreactor de 1L. Condiciones: 25 g/L de glicerol, tampón acetato 20 mM, 30°C, 750 rpm, caudal de aireación: 1 vvm y $C_X = 0,5$ g/L.

Tiempo (h)	Biomasa (g/L)	pH	Viables (UFC/mL)	Glicerol (g/L)	DHA producida (g/L)	Ácido glicérico producido (g/L)
0	0,43	5,26	5,20E+05	25,24	0,00	0,00
2	0,43	5,22		20,70	5,02	0,05
4	0,43	5,17	1,75E+05	16,16	9,26	0,11
6	0,41	5,13		11,61	13,02	0,18
8	0,42	5,09		7,07	15,87	0,23
10	0,40	5,04	2,83E+04	3,97	18,42	0,26
12	0,42	5,02		1,62	20,15	0,33
22	0,43	4,97	7,30E+03	0,21	22,48	0,35

Tabla 5.44. Resultados del experimento B-900 en resting cells llevado a cabo en biorreactor de 1L. Condiciones: 25 g/L de glicerol, tampón acetato 20 mM, 30°C, 900 rpm, caudal de aireación: 1 vvm y $C_X = 0,5$ g/L.

Tiempo (h)	Biomasa (g/L)	pH	Viables (UFC/mL)	Glicerol (g/L)	DHA producida (g/L)	Ácido glicérico producido (g/L)
0	0,44	5,35	8,80E+05	26,36	0,00	0,00
2	0,55	5,29		20,96	5,13	0,05
4	0,51	5,22	1,32E+05	15,46	10,37	0,11
6	0,49	5,17		10,37	15,32	0,19
8	0,49	5,13	9,60E+04	6,75	18,56	0,25
10	0,47	5,12	6,70E+04	3,45	20,78	0,27
24	0,45	5,11		0,54	23,72	0,31

Tabla 5.45. Datos registrados de concentración de oxígeno disuelto en el líquido (C_{O_2}) y porcentaje de oxígeno en la corriente gaseosa de salida del biorreactor (X_{O_2}).

Tiempo (min)	B-300		B-360	B-420		B-560		B-650	B-750	B-900	
	C_{O_2} (%)	X_{O_2} (%)	C_{O_2} (%)	C_{O_2} (%)	X_{O_2} (%)	C_{O_2} (%)	X_{O_2} (%)	C_{O_2} (%)	C_{O_2} (%)	C_{O_2} (%)	X_{O_2} (%)
0,0	100,0	20,68	100,0	100,0	20,48	100,00	20,67	100	100,00	100,00	20,67
1,5	75,7		94,7	80,9		82,40			93,8	84,5	
1,7	73,7		88,9	76,3		75,50			91,2	82,3	
2,0	58,8		85,6	71,6		68,90			90,3		
2,5	52,1		79,3	62,2		60,70		95,0	87,9	80,1	
2,8	40,5		74,0	57,1		57,00					
3,0	26,4		71,3	51,8		53,00		91,1	85,7		
3,2	17,4			46,5		50,30		87,9	83,7		
3,5	9,4			41,2		47,80		83,5			
4,0			65,5	29,7		42,10		79,2	81,1	79,1	
5,0			49,2	14,4		33,10		75,9	76,2		
5,5	3,7		41,4	9,6		29,60		71,1	74,4		
7,5			38,9	3,4		22,70		62,4	71,5		
15,8			19,6			10,00		33,4		78,0	
17,5			10,1					28,0		77,1	
30,0	0,8	20,49	2,5	4,5	20,13	12,60	20,17	14,1		75,3	20,54
33,5						16,90		15,0			
60,0		20,48	3,5		20,10	22,70	20,2	25,4	69,0	73,4	20,24
71,0								31,0			
79,0			4,1		20,19			36,2		72,3	
105,5								40,9		72,4	20,18
120,0	1,2	20,47	5,4	9,7	20,21	28,60	20,22	44,8	70,8	72,6	20,18
341,7	1,7	20,46	8,6	14,3	20,23	38,30	20,26	60,2	75,8	72,2	20,18
300,0		20,46	10,3		20,27		20,29	65,1	78,0	73,3	20,18
360,0	1,4	20,47	12,1	22,6	20,30	49,40	20,32	72,2	80,2	74,9	20,18
480,0	1,8	20,50	17,8	31,0	20,35	59,40	20,37	82,2	84,3	76,5	20,18
540,0		20,50	19,8					87,1	86,5	78,1	20,19
600,0	1,3	20,51	22,0	41,8	20,41	66,90	20,42	91,6	88,8	80,0	20,19
660,0		20,52	25,9					94,2	91,1	81,7	20,20
720,0	2,1	20,52	29,0	51,7	20,46	75,00	20,48	95,2	93,3	83,9	20,23
780,0	2,5	20,53	33,2						95,4	86,1	20,25
840,0	3,1	20,53	37,2	63,2	20,48	86,40	20,53	95,8	96,6	88,8	20,28
960,0	4,6	20,54	46,9	76,5	20,48	92,80	20,59	95,9	97,3	91,6	20,32
1200,0	8,8	20,59	66,7	92,8	20,48	96,00	20,61	96,1	97,7	93,4	20,38
1440,0	14,2	20,65	99,8	96,0	20,48	96,90	20,63			96,5	20,46
1680,0	26,6	20,68		97,5	20,48	97,20	20,65			97,7	20,54
1800,0	40,2	20,68		98,4	20,48	96,90	20,63			98,2	20,57
1920,0	67,4	20,68		99,1	20,48	96,90	20,65			98,4	20,59
2040,0	90,6	20,68		99,6	20,48	97,00	20,65			98,6	20,61
2280,0	99,5	20,68		100,0	20,48	97,20	20,66			98,7	20,62
2520,0	100,0	20,68		100,0	20,48					98,7	20,62

Tabla 5.46. Valores calculados de OTR, OUR y q_{O_2} para los experimentos B-300, B-360, B-420 y B-560.

Tiempo (min)	B-300			B-360			B-420			B-560		
	OTR $\cdot 10^6$	OUR $\cdot 10^6$	q_{O_2} $\cdot 10^6$	OTR $\cdot 10^6$	OUR $\cdot 10^6$	q_{O_2} $\cdot 10^6$	OTR $\cdot 10^6$	OUR $\cdot 10^6$	q_{O_2} $\cdot 10^6$	OTR $\cdot 10^6$	OUR $\cdot 10^6$	q_{O_2} $\cdot 10^6$
	(mol/L·s)		(mol/ gX·s)	(mol/L·s)		(mol/ gX·s)	(mol/L·s)		(mol/ gX·s)	(mol/L·s)		(mol/ gX·s)
0,0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1,5	0,34	0,85		0,09	0,63		0,45	1,12		0,63	1,44	
1,8	0,37	1,77		0,18	0,95		0,56	1,36		0,87	2,01	
2,0	0,57	2,09		0,24	0,80		0,67	1,47		1,11	2,01	
2,5	0,67	1,92		0,34	1,04		0,90	1,70		1,40	2,07	
2,8	0,83	2,98		0,43	1,09		1,02	1,88		1,53	2,20	
3,0	1,03	2,97		0,47	0,82		1,14	2,04		1,68	2,21	
3,3	1,15	2,58					1,27	2,13		1,77	2,21	
3,5	1,26	2,00					1,39	2,31		1,86	2,33	
4,0				0,56	0,92		1,67	2,47		2,07	2,49	
5,0				0,83	0,91		2,03	2,55		2,39	2,72	
5,5	1,34	1,41		0,96	1,12		2,14	2,41		2,51	2,73	
7,5				1,00	1,13		2,29	2,35		2,76	2,86	
15,8				1,31	1,33					3,21	3,24	
17,5				1,47	1,47							
30,0	1,18	1,19		1,59	1,59		2,18	2,18	4,54	3,12	3,09	
33,5												
60,0	1,25			1,58	1,58		2,37			2,93	2,92	6,94
71,0												
79,0				1,57	1,57		1,81					
105,5												
120,0	1,31	1,31	2,55	1,55	1,55	4,02	1,68	1,68	3,66	2,81	2,80	6,71
241,8	1,37	1,37	2,79	1,49	1,49	3,94	1,56	1,56	3,46	2,56	2,55	6,91
300,0	1,37			1,47	1,46		1,31			2,37		
360,0	1,31	1,31	2,63	1,44	1,43	4,04	1,12	1,12		2,18	2,18	6,70
480,0	1,12	1,12		1,34	1,34	4,02	0,81	0,81	1,92	1,87	1,87	4,98
540,0	1,12			1,31	1,31							
600,0	1,06	1,06		1,28	1,27		0,44	0,43		1,56	1,56	4,37
660,0	1,00			1,21	1,21							
720,0	1,00	1,00		1,16	1,16		0,12			1,18	1,18	
780,0	0,94	0,93		1,09	1,09							
840,0	0,94	0,93		1,03	1,03					0,87	0,87	
960,0	0,87	0,87		0,87	0,87					0,50	0,50	
1200,0	0,56	0,56	1,29	0,54	0,54	1,88				0,37	0,37	
1440,0	0,19	0,19	0,43							0,25	0,25	0,81
1680,0										0,12	0,12	
1800,0										0,25	0,25	
1920,0										0,12	0,12	
2040,0										0,12	0,12	
2280,0										0,06	0,06	

Tabla 5.47. Valores calculados de OTR, OUR y q_{O_2} para los experimentos B-650, B-750 y B-900.

Tiempo (min)	B-650			B-750			B-900		
	OTR $\cdot 10^6$	OUR $\cdot 10^6$	q_{O_2} $\cdot 10^6$	OTR $\cdot 10^6$	OUR $\cdot 10^6$	q_{O_2} $\cdot 10^6$	OTR $\cdot 10^6$	OUR $\cdot 10^6$	q_{O_2} $\cdot 10^6$
	(mol/L·s)	(mol/gX·s)		(mol/L·s)	(mol/gX·s)		(mol/L·s)	(mol/gX·s)	
0,0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
1,5				0,57	0,88		1,89	2,29	
1,7				0,81	1,11		2,15	2,40	
2,0				0,89	1,06				
2,5	0,33	0,53		1,11	1,30		2,42	2,50	
2,8									
3,0	0,58	1,02		1,32	1,57				
3,2	0,79	1,43		1,50	1,75				
3,5	1,08	1,63							
4,0	1,37	1,62		1,74	1,92		2,54	2,56	
5,0	1,58	1,85		2,19	2,37				
5,5	1,90	2,19		2,36	2,47				
7,5	2,47	2,63		2,62	2,65				
15,8	4,37	4,51					2,68	2,69	
17,5	4,73	4,82					2,79	2,80	
30,0	5,64	5,66					0,81	0,81	
33,5	5,58	5,57							
60,0	4,90	4,88		2,85	2,85		2,68	2,68	
71,0	4,53	4,51							
79,0	4,19	4,17							
105,5	3,88	3,87					3,06	3,05	
120,0	3,62	3,62	7,12	2,69	2,69	6,27	3,06	3,06	5,57
341,7	2,61	2,61	5,31	2,23	2,23	5,24	3,06	3,05	
300,0	2,29	2,29		2,03	2,02		3,06	3,05	
360,0	1,83	1,82	3,85	1,82	1,82	4,47	3,06	3,05	
480,0	1,17	1,17	2,68	1,45	1,44	3,44	3,06	3,05	5,99
540,0	0,85	0,84		1,24	1,24		2,99	2,99	
600,0	0,55	0,55	1,14	1,03	1,03	2,57	2,99	2,99	
660,0	0,38	0,38		0,82	0,82		2,93	2,93	
720,0	0,32	0,31		0,62	0,62	1,47	2,74	2,74	5,63
780,0				0,42	0,42		2,62	2,62	
840,0	0,28	0,28		0,31	0,31		2,43	2,43	
960,0	0,27	0,27		0,25	0,25		2,18	2,18	
1200,0	0,26	0,26	0,26	0,21	0,21	0,49	1,81	1,81	1,81
1440,0							1,31	1,31	
1680,0							0,81	0,81	0,81
1800,0							0,62	0,62	
1920,0							0,50	0,50	
2040,0							0,37	0,37	
2280,0							0,31	0,31	

➤ Discusión de los resultados

En la Figura 5.15 se han representado los valores de k_{La} experimentales y predichos según la metodología de García-Ochoa y Gómez (2004) frente a la agitación, con el fin de evaluar la robustez de dicho método predictivo para la estimación de k_{La} , dado que ha sido empleado en aquellos experimentos en los que no fue posible determinar este coeficiente de transferencia de materia experimentalmente. Como se puede apreciar, los valores teóricos y experimentales de k_{La} no presentan grandes discrepancias. Por lo tanto, queda validado el método predictivo empleado para el cálculo de k_{La} en aquellos experimentos en los que no se registraron los datos de la composición de salida de la corriente gaseosa (B-360, B-650 y B-750). Una buena estimación de k_{La} es importante para proseguir con el estudio de la influencia del oxígeno porque dicho valor se emplea como dato de partida para calcular OTR, que a su vez, se emplea para calcular OUR y posteriormente q_{O_2} en los experimentos citados entre paréntesis.

De acuerdo con estos resultados, el valor de k_{La} aumenta de manera potencial al aumentar la agitación (N), siguiendo una tendencia marcada por la ecuación [5.9].

$$k_{La} \text{ (s}^{-1}\text{)} = 6,018 \cdot 10^{-9} \cdot N(\text{rpm})^{2,36} \quad \therefore \quad r^2 = 0,999 \quad [5.9]$$

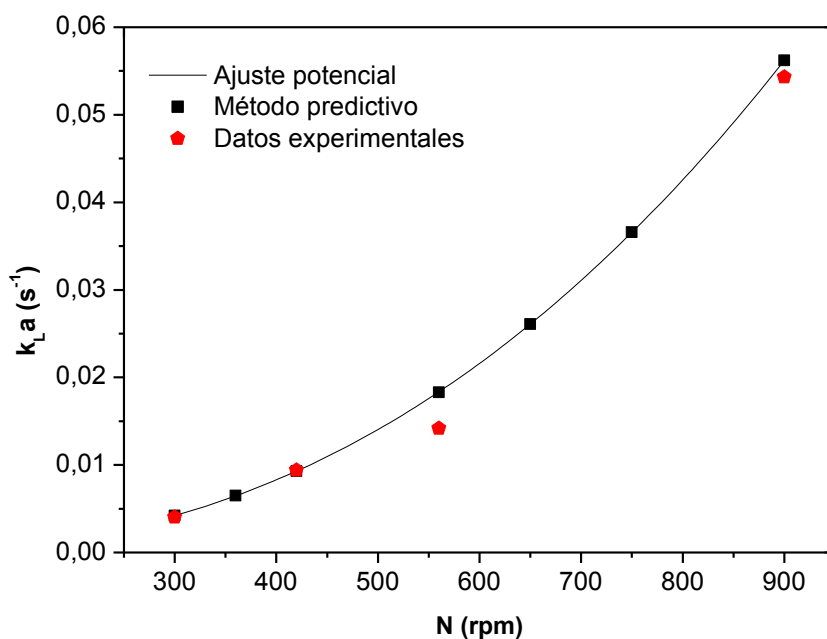


Figura 5.15. Influencia de la velocidad de agitación sobre k_{La} calculado a partir de los datos experimentales y según el método predictivo descrito en el Apartado 2.5.1.

En la Figura 5.16 se muestran los resultados globales de los experimentos realizados a distintas agitaciones en forma de evolución con el tiempo de las concentraciones de glicerol, DHA y ácido glicérico, así como del valor de pH y de la concentración de oxígeno disuelto.

Analizando de manera cualitativa las tendencias, se aprecia que para agitaciones bajas (300 y 360 rpm) el consumo de glicerol y, por ende, la producción de DHA, transcurren de manera más lenta que a agitaciones más altas. Sin embargo, a medida que aumenta la agitación parece que las diferencias en la velocidad de producción se van estrechando. No ocurre lo mismo con la producción de ácido glicérico. En la Figura 5.16 (c) todos los datos de los distintos experimentos se encuentran aparentemente muy cercanos, indicando que la velocidad a la que se produce el subproducto es independiente de la agitación. No obstante, cabe destacar que la concentración final de ácido glicérico acumulada es mayor cuanto menor es la agitación, debido al aumento del tiempo de reacción. En cualquier caso, tanto la producción de DHA, como de ácido glicérico se van a analizar cuantitativamente más adelante.

En cuanto a la evolución del pH, no se aprecian diferencias significativas comparando los distintos experimentos, como era de esperar, ya que el efecto amortiguador del pH producido por el tampón acetato hace que el valor de pH se mantenga en torno a 5 sin grandes variaciones.

Atendiendo a la evolución de la concentración de oxígeno disuelto, se observa que esta variable cambia con el tiempo, aunque en todos los experimentos presenta una evolución similar: durante los primeros 8 minutos aproximadamente se produce una caída muy acusada del oxígeno disuelto y, a continuación, se aprecia un aumento paulatino del mismo hasta alcanzar el 100% de saturación, momento en el cual se ha agotado el glicerol y ha finalizado el proceso. Dado que la concentración de oxígeno disuelto es un reflejo del balance entre OTR y OUR, la evolución descrita anteriormente se debe a que a tiempos muy cortos, tal y como se muestra en la Figura 5.17 (a), la velocidad de consumo de oxígeno es mucho mayor que la velocidad de transporte y, por ello, la concentración de oxígeno disuelto en el líquido disminuye. Para tiempos más altos ocurre lo contrario, acumulándose oxígeno en el caldo, tal y como se observa en la Figura 5.16 (e). Cabe destacar que dicha acumulación es tan lenta, que apenas se aprecian diferencias entre OTR y OUR (Figura 5.17 (b)).

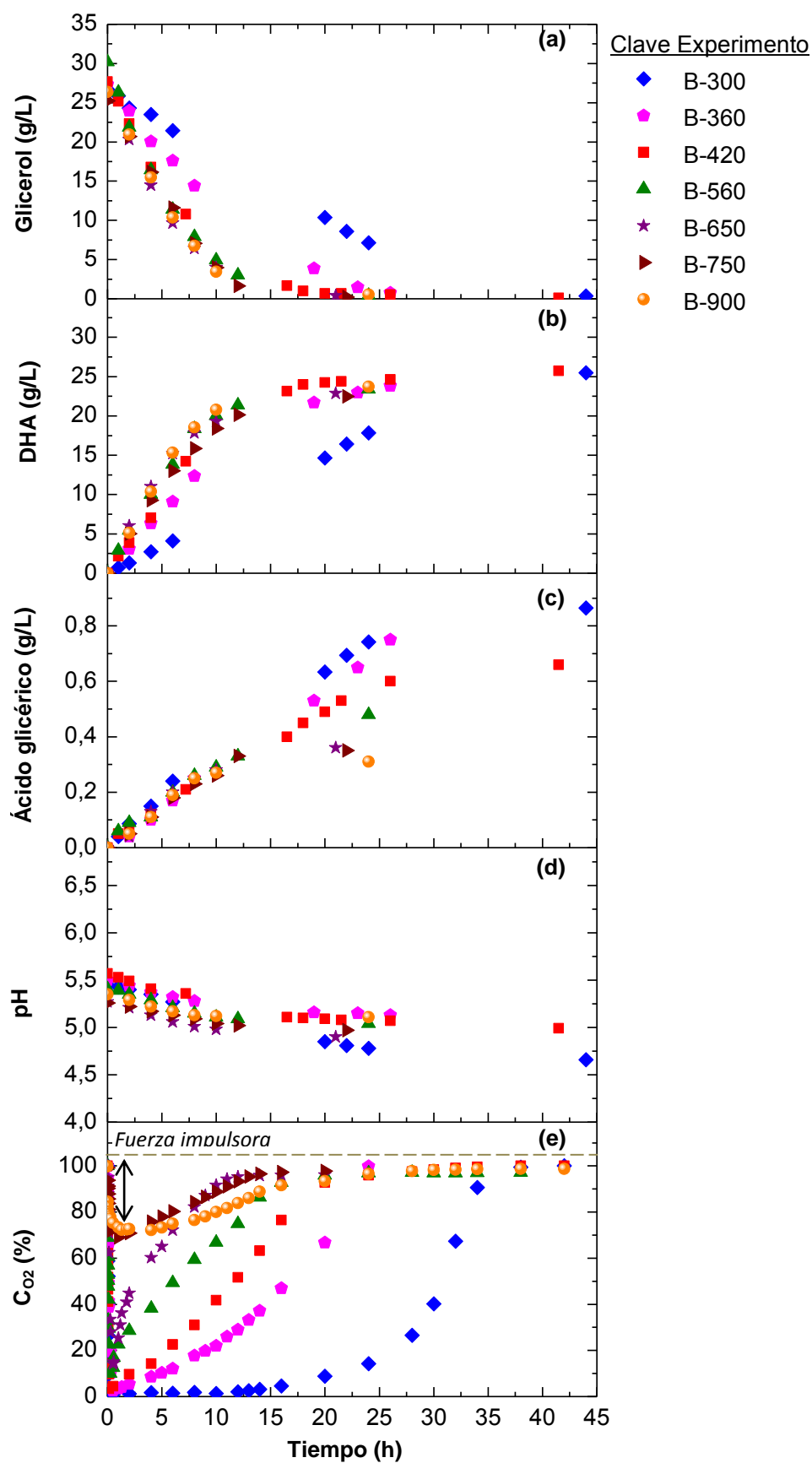


Figura 5.16. Evolución con el tiempo del glicerol (a); la DHA (b); el ácido glicérico (c), el pH (d) y el oxígeno disuelto (e) para los experimentos realizados a distintas agitaciones en biorreactor.

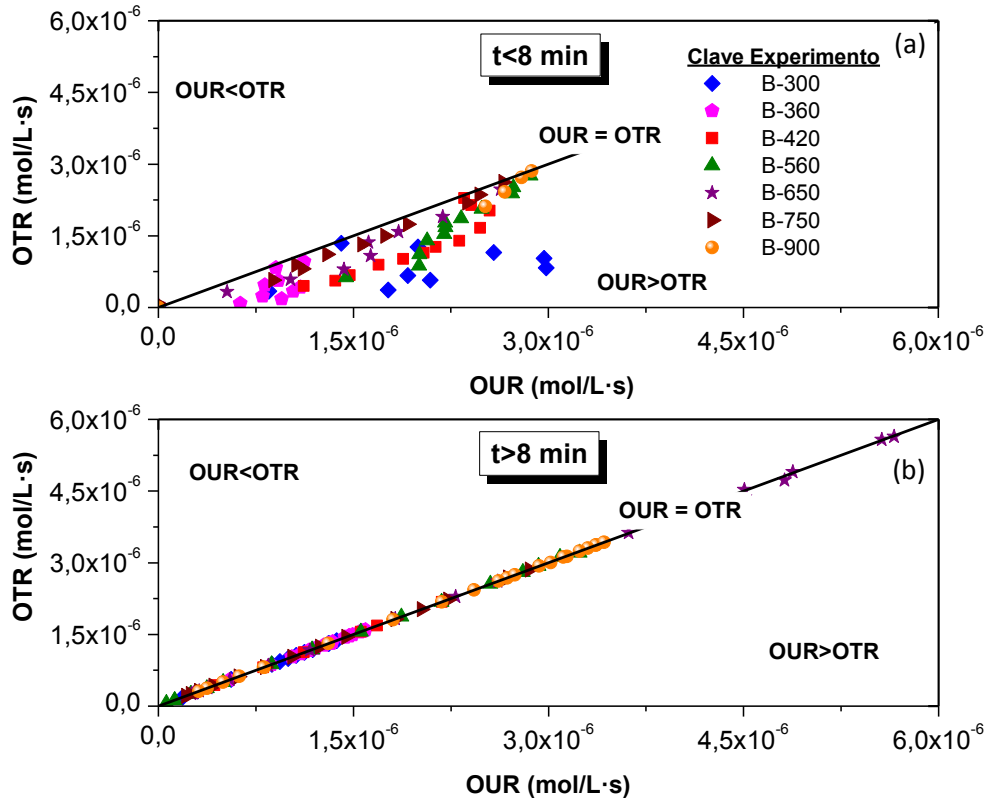


Figura 5.17. OTR vs OUR para tiempos menores de 8 min (gráfica (a)) y para tiempos mayores de 8 min (gráfica (b)). La línea negra continua muestra la bisectriz, en la cual se cumple que $OTR=OUR$.

Volviendo a la Figura 5.16 (e), al comparar los datos de oxígeno disuelto en los diferentes experimentos se observa que al aumentar la agitación y, consiguientemente, k_{La} , aumenta el porcentaje de oxígeno disuelto en el caldo. Para comprobar cómo se relaciona este aspecto con la velocidad de transferencia de oxígeno, en la Figura 5.18 se ha representado el valor máximo de OTR en cada experimento ($OTR_{exp.}^{máx.}$) frente a k_{La} y se ha comparado con el valor máximo teórico ($OTR_{teórico}^{máx.}$).

Según la definición de OTR, representada por la ecuación [5.7], la máxima velocidad de transporte se alcanza cuando $C_{O_2} = 0$; es decir, cuando la fuerza impulsora es máxima, simplificándose la ecuación anterior a la expresión [5.10], que permite el cálculo de la velocidad máxima teórica de transporte de oxígeno.

$$OTR_{teórico}^{máx.} = k_L a \cdot C_{O_2}^* \quad [5.10]$$

La Figura 5.18 muestra que los valores de $OTR_{teórico}^{máx.}$ y $OTR_{exp.}^{máx.}$ son prácticamente coincidentes para agitaciones menores de 650 rpm. Sin embargo, $OTR_{exp.}^{máx.}$ va

distanciándose cada vez más del valor esperado a medida que aumenta la agitación por encima de 650 rpm, siendo siempre inferior al valor máximo teórico. Dado que el valor de k_{La} aumenta con la agitación, tal y como se demostró en la Figura 5.15, la observación anterior se debe a que la fuerza impulsora ($C_{O_2}^* - C_{O_2}$) en los experimentos a mayor agitación no es lo suficientemente grande como para producir un aumento de la velocidad de transporte de oxígeno del gas al líquido. De hecho, hay una clara evidencia de esto en la Figura 5.16 (e), en la cual se aprecia de manera cualitativa que los experimentos B-750 y B-900 presentan una fuerza impulsora muy inferior a la del resto de experimentos. No obstante, para cuantificar este hecho, se ha definido un factor de efectividad de transferencia de materia (η_{TM}) según la ecuación [5.11], que da una idea de la eficacia con la que se está produciendo la transferencia de oxígeno del gas al líquido.

$$\eta_{TM} = \frac{OTR}{OTR^{máx.}} = 1 - \frac{C_{O_2}}{C_{O_2}^*} \quad [5.11]$$

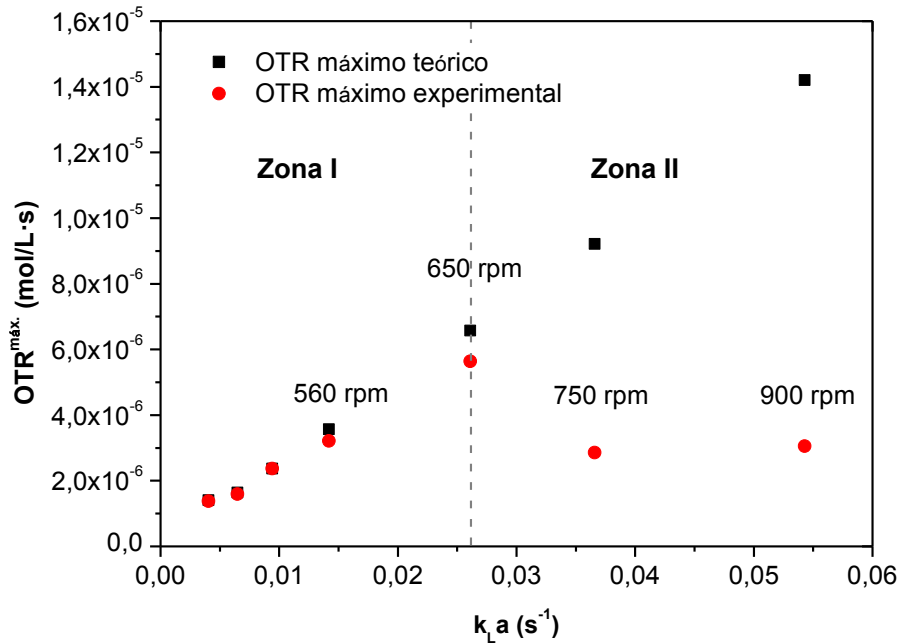


Figura 5.18. Influencia de k_{La} sobre el valor máximo de OTR teórico y experimental.

En la Figura 5.19 se observa que dicho factor de efectividad aumenta hasta alcanzar su máximo valor experimental ($\eta_{TM}^{máx.}$) a los pocos minutos de comenzar el experimento y, a continuación, disminuye con el tiempo hasta anularse cuando el experimento ha finalizado. Cabe destacar que el factor de efectividad se mantiene muy

cercano a la unidad a lo largo de todo el experimento B-300, lo que indica que en este caso la velocidad de transferencia es máxima durante todo el experimento (al permanecer el oxígeno disuelto en valores cercanos a 0, la fuerza impulsora es máxima).

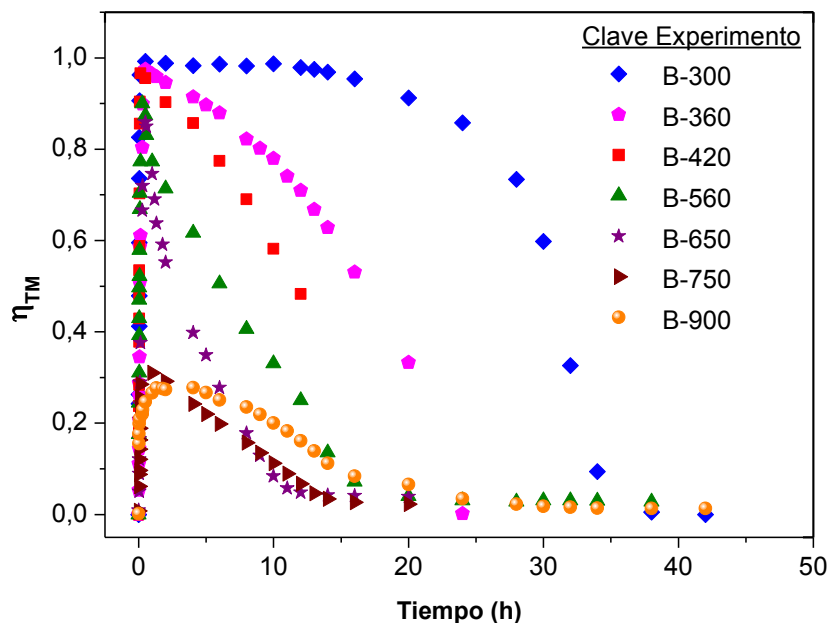


Figura 5.19. Evolución del factor de efectividad de transferencia de materia (η_{TM}) con el tiempo para los experimentos a distintas agitaciones.

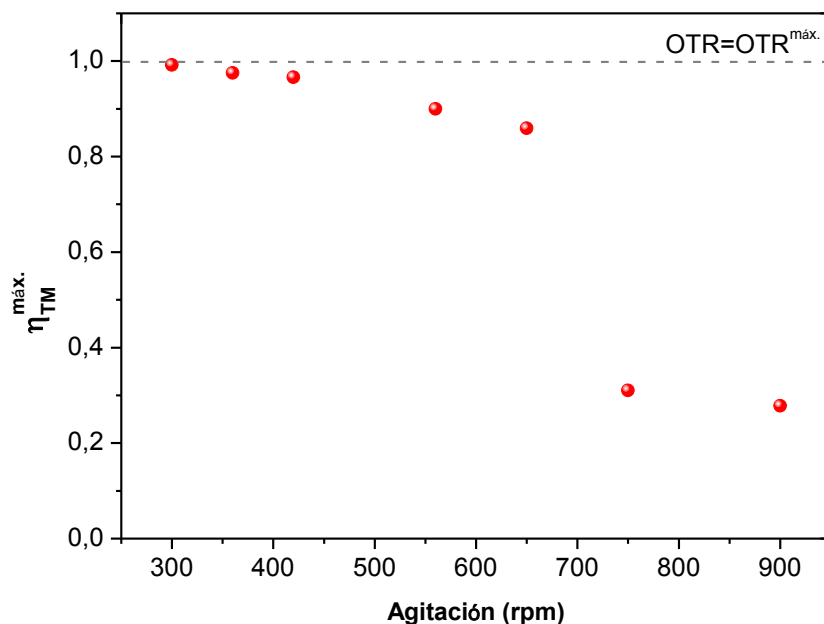


Figura 5.20. Factor de efectividad de transferencia de materia máximo ($\eta_{TM}^{máx.}$) para cada una de las agitaciones.

Si se compara el valor máximo del factor de efectividad obtenido en cada experimento, se aprecia que, para agitaciones menores de 650 rpm, dicho valor está muy cercano a la unidad, mientras que para agitaciones mayores el factor de efectividad de transferencia de materia máximo disminuye hasta tal punto que a 750 y 900 rpm alcanza valores inferiores a 0,35, tal y como muestra la Figura 5.20. Por lo tanto, en dichos experimentos, el sistema no está trabajando a su plena capacidad en términos de velocidad de transferencia de oxígeno.

Cabe preguntarse cuál es la razón de que el factor de efectividad de transferencia de materia sea tan pequeño en los experimentos a mayor agitación: B-750 y B-900. Examinando de nuevo la ecuación [5.11], se deduce que el factor de efectividad es pequeño cuando la concentración de oxígeno disuelto es elevada, aspecto que puede comprobarse en la Figura 5.16 (e) para los experimentos anteriormente mencionados. Teniendo en cuenta que la concentración de oxígeno disuelto en el líquido es el resultado del balance entre OTR y OUR, según la ecuación [5.6], y conociendo que $OTR_{exp}^{máx.}$ no aumenta con la agitación según lo esperado en los experimentos B-650, B-750 y B-900, la respuesta ha de hallarse en el valor de OUR. En la Figura 5.21 se ha representado el valor máximo experimental de OUR en función de $k_L a$ para cada experimento.

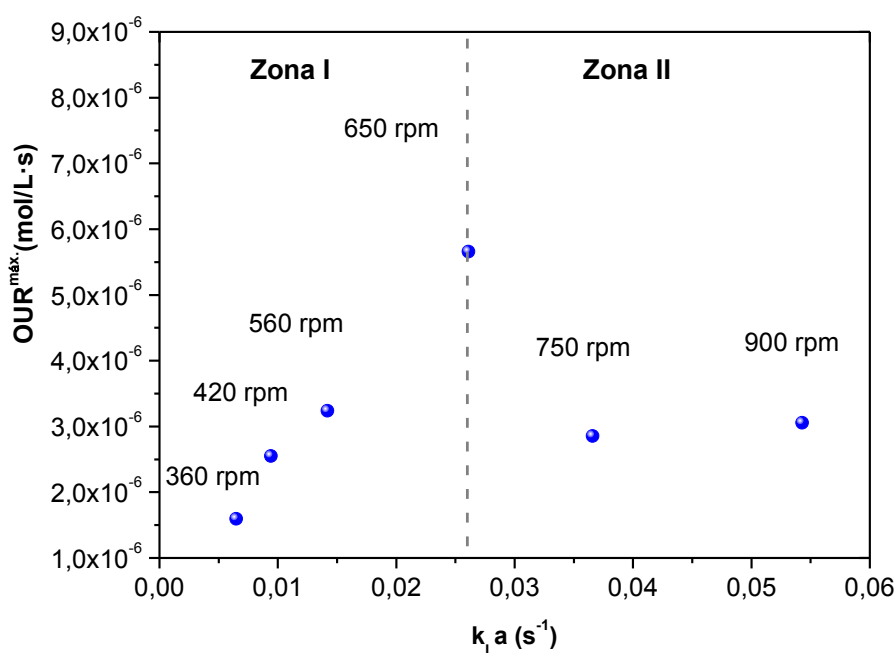


Figura 5.21. Influencia de $k_L a$ sobre el valor máximo de OUR.

En la Figura 5.21 se distinguen visiblemente dos zonas: la zona (I), para agitaciones inferiores a 650 rpm, en la cual la velocidad de consumo de oxígeno depende manifiestamente de k_{La} , revelando que esta zona está controlada por la etapa de transferencia de oxígeno; y la zona (II), a agitaciones mayores de 650 rpm, en la cual se produce un descenso en la velocidad máxima de consumo de oxígeno. Esta tendencia podría estar indicando que cuando se emplean agitaciones altas las células están sufriendo algún tipo de estrés hidrodinámico (García-Ochoa y col., 2015).

Dado que en los experimentos realizados a 750 y 900 rpm se ha registrado una velocidad de consumo de oxígeno más baja de lo esperado, esto ha conducido a que el porcentaje de oxígeno disuelto en ambos casos sea tan alto (ver ecuación [5.6]), la fuerza impulsora tan pequeña y el factor de efectividad de transferencia de materia tan bajo; justificando así, los resultados mostrados en las Figuras 5.18 y 5.20. Por lo tanto, estas observaciones son un claro ejemplo de cómo el valor de OUR puede condicionar OTR cuando no hay limitación al transporte: en la zona (I), en la cual, el proceso está limitado por la transferencia de materia, se cumple que $OTR_{exp.}^{máx.} = OTR_{teórico}^{máx.}$; sin embargo, en la zona (II), en ausencia de limitaciones al transporte, se observa que $OTR_{exp.}^{máx.} < OTR_{teórico}^{máx.}$ (Figura 5.18). Es más, revisando de nuevo la Figura 5.17, destaca que OUR puede ser muy superior a OTR (Figura 5.17 (a)), como puede observarse a tiempos en los que el oxígeno disuelto cae bruscamente ($t < 8$ min); mientras que los valores de OTR nunca son muy diferentes de los de OUR, a tiempos en los cuales aumenta el oxígeno disuelto (Figura 5.17 (b)), reflejando la gran influencia que ejerce OUR sobre el valor de OTR en este caso.

Tras comprobar el efecto de k_{La} sobre los valores máximos de OTR y OUR, y analizar la influencia de OUR sobre OTR, falta estudiar la repercusión de estos parámetros sobre la producción de DHA y de ácido glicérico. Para ello, se va a llevar a cabo un análisis cuantitativo mediante el cálculo de la actividad enzimática (a_0) y de la velocidad inicial de producción del subproducto (R_{GA}^0) para ver cómo se ven afectadas dichas velocidades en función de los parámetros anteriores y poder extraer conclusiones.

5.2.1 Efecto de k_{La} sobre la actividad enzimática (a_0)

En la Figura 5.23 se han representado los ajustes lineales de la concentración de DHA frente al tiempo realizados para el cálculo de la actividad enzimática y en la Tabla 5.48 se muestran los valores obtenidos de dicha actividad.

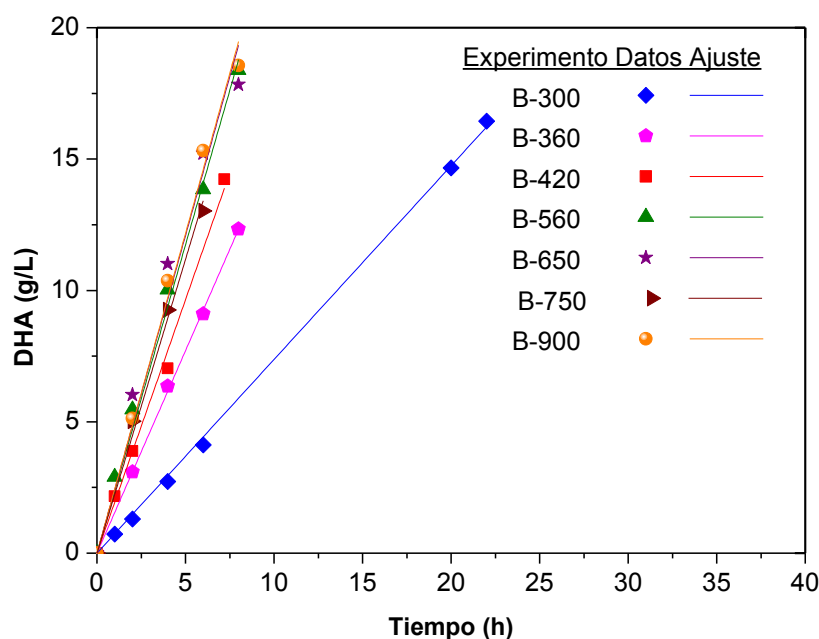


Figura 5.22. Representación de los ajustes lineales de los datos de concentración de DHA frente al tiempo para los experimentos realizados a distintas agitaciones en biorreactor con una concentración de células en estado de resting cells de 0,5 g/L para el cálculo de la actividad enzimática.

Tabla 5.48. Valores de actividad enzimática (a_0) de los experimentos realizados en biorreactor con células en resting cells a distintas agitaciones.

Experimento	Agitación (rpm)	k_{La} (s^{-1})	a_0 ($g_{DHA}/L \cdot h$)	r^2
B-300	300	0,0041	0,74	0,999
B-360	360	0,0065	1,54	0,999
B-420	420	0,0094	1,93	0,997
B-560	560	0,0142	2,35	0,997
B-650	650	0,0261	2,42	0,989
B-750	750	0,0366	2,24	0,997
B-900	900	0,0543	2,43	0,997

Para corroborar la hipótesis de partida: “la actividad enzimática no es proporcional a la cantidad de biomasa debido a que el aporte de oxígeno por célula es insuficiente”, se ha escogido como parámetro más representativo el valor más alto de q_{O_2} en cada experimento, que es una medida de la velocidad máxima de consumo de oxígeno por gramo de biomasa para cada agitación y se ha representado frente a k_La , relacionándolo con la evolución de a_0 en la Figura 5.23.

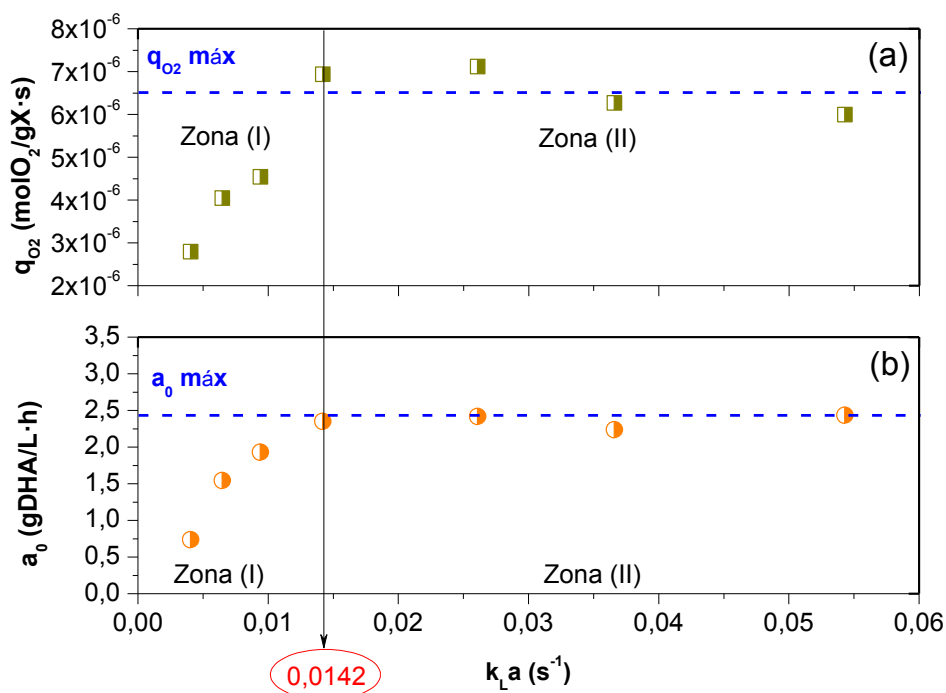


Figura 5.23. Efecto de k_La sobre q_{O_2} (gráfica (a)) y a_0 (gráfica (b)). La línea negra continua en posición vertical divide las gráficas en dos zonas: zona (I) en la que se aprecia una limitación por oxígeno y la zona (II) en la que los resultados no se ven afectados por el aporte de oxígeno.

La evolución de a_0 con k_La es paralela a la de q_{O_2} , identificándose en ambas gráficas claramente dos zonas; igual que ocurría en la gráfica de $OUR^{máx.}$ frente a k_La (Figura 5.21): la zona (I) se caracteriza por una fuerte influencia de k_La sobre q_{O_2} y a_0 , lo que indica que ambos fenómenos están relacionados. Esto es, la causa por la cual la actividad enzimática no alcanza su máximo valor en esta zona es porque el consumo específico de oxígeno está limitado por k_La , o lo que es lo mismo, por la velocidad de transferencia de oxígeno al líquido que constituye, en este caso, el fenómeno más lento, controlando la velocidad macroscópica a la que se lleva a cabo el proceso (a_0). De este modo, se confirma la hipótesis inicial. En la zona (II), sin embargo, se ha alcanzado el

valor máximo de q_{O_2} y, con ello, la actividad enzimática máxima, por lo que un aumento de k_{La} no conlleva un aumento ni de q_{O_2} ni de a_0 ; es decir, ambos valores son independientes del aporte de oxígeno, lo que significa que en esta zona ya no se da la limitación por transporte de oxígeno descrita anteriormente. Cabe señalar que la limitación por oxígeno deja de producirse cuando k_{La} alcanza un valor de $0,0142 \text{ s}^{-1}$, que se corresponde con una agitación de 560 rpm aproximadamente, según la Figura 5.16. Dicha agitación podría establecerse como valor óptimo, ya que se alcanza el valor máximo de q_{O_2} y la actividad enzimática es también máxima. Sin embargo, en la Figura 5.21 el valor de OUR máximo se alcanzaba a 650 rpm en vez de a 560 rpm, probablemente debido a que había mayor cantidad de biomasa en ese momento en el experimento B-650 y por ello, un OUR más alto.

Para completar el estudio, se ha determinado la concentración crítica de oxígeno disuelto representando en la Figura 5.24 la velocidad específica de consumo de oxígeno frente a la concentración mínima de oxígeno disuelto detectada en cada experimento. Los resultados muestran que por debajo del 10 % de oxígeno disuelto en el caldo con respecto al valor de saturación, el proceso está controlado por la transferencia de oxígeno. Por lo tanto, $C_{O_2}^{Crit} = 10 \%$. Lo que significa que la concentración de oxígeno disuelto debe ser superior al 10 % para evitar que la velocidad del proceso esté limitada.

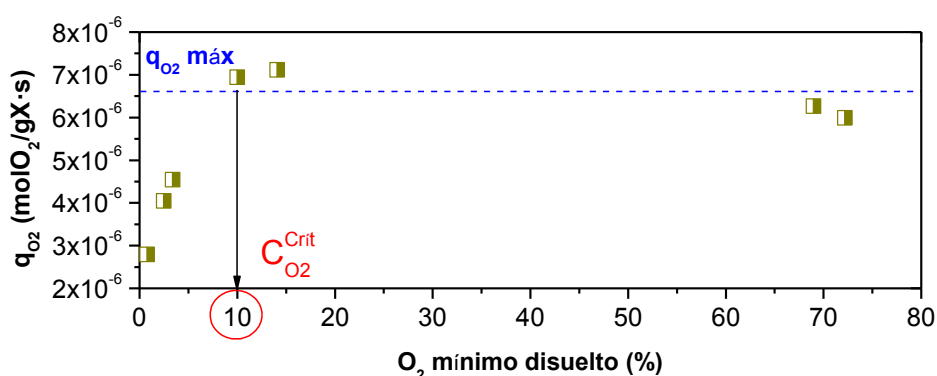


Figura 5.24. Representación de la influencia de la concentración mínima de oxígeno disuelto sobre q_{O_2} .

Por último, comparando la evolución de la velocidad de consumo de oxígeno específica (q_{O_2}) con la velocidad de consumo global ($OUR^{max.}$) según muestra la Figura 5.25, resulta llamativo que en la zona (II) el valor de $OUR^{max.}$ disminuya tanto, mientras

que q_{O_2} permanece prácticamente constante. Según la ecuación [5.8], OUR es el resultado del producto entre q_{O_2} y C_X , dado que la velocidad específica de consumo se puede considerar que permanece constante, la causa de que disminuya $OUR^{max.}$ puede estar relacionada con una merma en la concentración de biomasa al aumentar la agitación. Para comprobar este aspecto, se ha realizado un conteo en placa de las células viables tomando muestras en algunos de los experimentos a distintos tiempos. Aunque este método no es demasiado fiable en términos cuantitativos, da una idea de lo que está ocurriendo en el proceso. Así, los resultados mostrados en la Figura 5.26 presentan una tendencia clara: el porcentaje de células viables desciende drásticamente con el tiempo en todos los experimentos, aunque este descenso parece ser más acusado a medida que aumenta la agitación. Según Zheng y col. (2016), para agitaciones superiores a 500 rpm las células están expuestas a elevados esfuerzos cortantes que pueden provocar deformación y/o daño celular, aunque este hecho depende del microorganismo e incluso de la cepa (García-Ochoa y col., 2010). En este caso, el daño celular podría explicar la disminución de $OUR^{max.}$ en la Figura 5.25, poniendo de manifiesto la existencia de estrés hidrodinámico en el biorreactor. No obstante, es importante resaltar que, a pesar del daño celular, la actividad enzimática permanece constante (Figura 5.23 (b)) y no decae a agitaciones altas, lo que pone de relieve la robustez de la enzima glicerol deshidrogenasa como ya habían apuntado otros autores (Bauer y col., 2005).

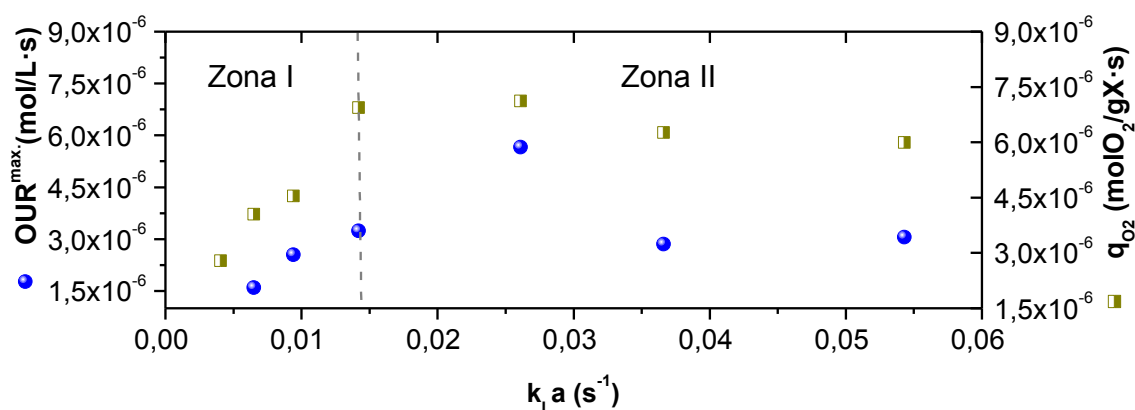


Figura 5.25. Comparación de la evolución de los valores máximos experimentales de OUR y q_{O_2} con $k_L a$. La línea vertical discontinua indica la separación entre la zona (I) y la zona (II).

Aun así, es conveniente preservar la viabilidad celular con vistas a una futura regeneración y reutilización del biocatalizador en el proceso. Una forma de atenuar el estrés hidrodinámico podría ser protegiendo a las células mediante técnicas de encapsulación. Según Cassidy y col. (1996), la encapsulación puede aumentar la supervivencia celular porque además de proteger a las células de las condiciones externas adversas, genera un microambiente más estable en su interior y evita que las células estén en contacto directo con compuestos tóxicos presentes en el caldo de cultivo. Además, permite trabajar con un mayor número de células, entre otras ventajas. Por ello, la producción de DHA con células inmovilizadas se va a abordar en el siguiente Capítulo.

Por otro lado, al comienzo de este Apartado se comentó que el cultivo era más activo a tiempos cortos, ya que OUR durante los primeros minutos era mayor que OTR, pero luego iba disminuyendo con el tiempo hasta invertirse la relación entre ambas velocidades (Figura 5.17); pues bien, tras analizar la evolución de las viables, se puede afirmar que el descenso de actividad en el cultivo (medido como consumo de oxígeno) se debe precisamente al daño celular ocasionado por stress hidrodinámico con el tiempo.

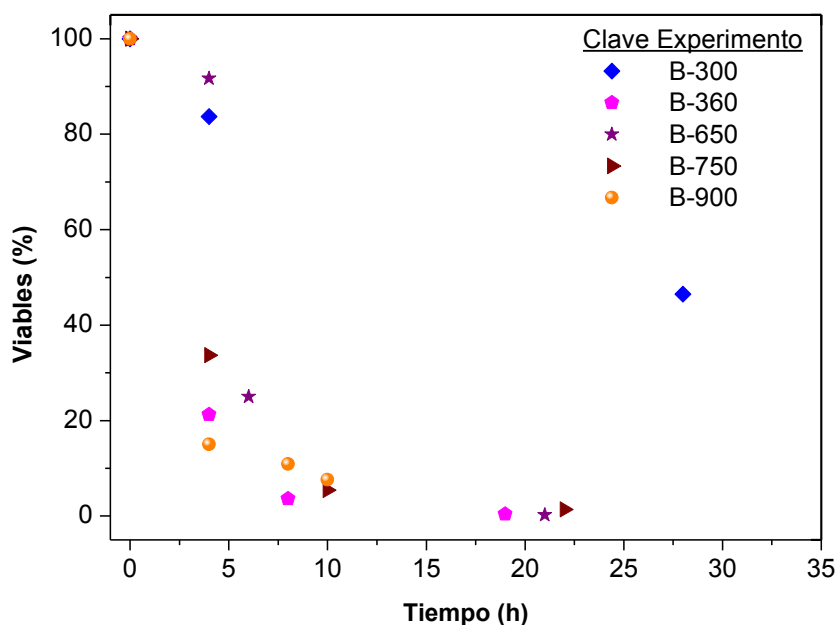


Figura 5.26. Evolución del número de células viables (%) con el tiempo.

5.2.2 Efecto de k_{La} sobre la producción de ácido glicérico

Finalmente, se va a evaluar el efecto de k_{La} sobre la producción de ácido glicérico. Cabe recordar que en la Figura 5.16 (c) se puede observar de manera semi-cuantitativa que la velocidad inicial de producción de ácido glicérico es muy similar en todos los casos, mientras que la concentración final de este subproducto es más alta en los experimentos realizados con una menor agitación. Con el objetivo de comprobar cuantitativamente estas observaciones y hallar una explicación plausible, se ha calculado la velocidad inicial de producción de ácido glicérico como la pendiente de la curva de producción del mismo a tiempos cortos (Figura 5.27). Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 5.49, incluyendo la bondad de los ajustes, expresada como r^2 , que en todos los casos ronda el valor de 0,99. Con los datos de dicha tabla se ha elaborado la Figura 5.28, que muestra el efecto de k_{La} sobre la velocidad inicial de producción de ácido glicérico (R_{GA}^0), su concentración final (C_{GA}^{final}) y la selectividad hacia dicho subproducto (S_{GA}), definida según la ecuación [5.12], para dilucidar si existe alguna relación entre la producción de ácido glicérico y el aporte de oxígeno.

$$S_{GA} \left(\frac{gGA}{gDHA} \right) = \frac{R_{GA}^0}{R_{DHA}^0} \quad [5.12]$$

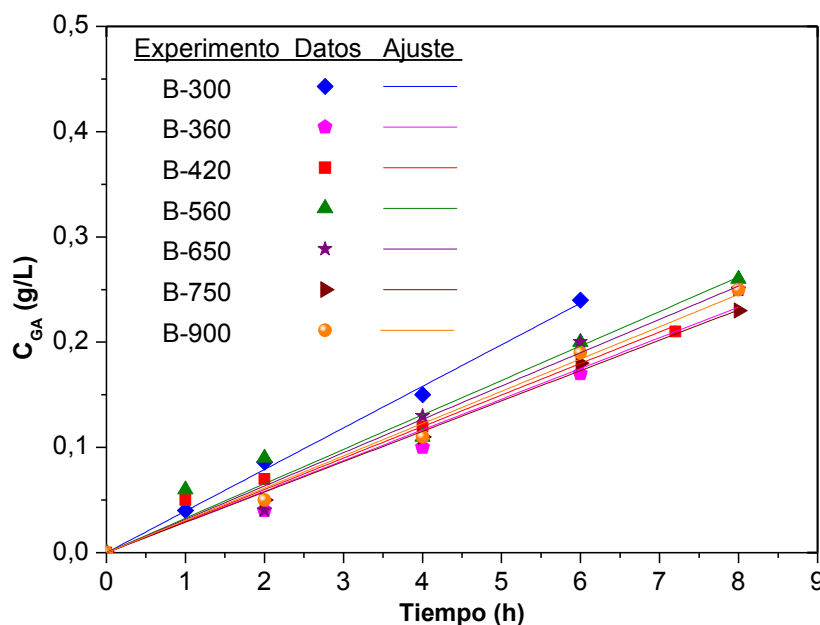


Figura 5.27. Representación de los ajustes lineales de los datos de concentración de ácido glicérico frente al tiempo para los experimentos realizados a distintas agitaciones en biorreactor con una concentración de células en estado de resting cells de 0,5 g/L para el cálculo de R_{GA}^0 .

Tabla 5.49. Valores de velocidad inicial de producción de ácido glicérico (R_{GA}^0) de los experimentos realizados en biorreactor con células en resting cells a distintas agitaciones.

Experimento	Agitación (rpm)	k_{La} (s^{-1})	R_{GA}^0 ($g_{GA}/L \cdot h$)	r^2
B-300	300	0,0041	0,040	0,998
B-360	360	0,0065	0,029	0,989
B-420	420	0,0094	0,030	0,989
B-560	560	0,0142	0,033	0,984
B-650	650	0,0261	0,032	0,993
B-750	750	0,0366	0,029	0,998
B-900	900	0,0543	0,031	0,996

Atendiendo a la Figura 5.28 (a), se puede concluir que la velocidad de producción de ácido glicérico no depende de k_{La} , ni por tanto, del oxígeno disuelto en el caldo, ya que en todos los experimentos es prácticamente la misma. Teniendo en cuenta este aspecto y que los experimentos a mayor agitación (mayor k_{La}) finalizan antes porque la velocidad de producción de DHA es más rápida, el resultado de la Figura 5.28 (b) es coherente: para una misma velocidad de producción de ácido glicérico, el aumento del tiempo de reacción en los experimentos realizados con agitaciones más bajas conduce a una mayor acumulación de subproducto. Esto se debe a que la selectividad hacia el subproducto es mayor en la zona (I) y va disminuyendo al aumentar k_{La} hasta alcanzar un valor constante, que se mantiene a lo largo de la zona (II), como muestra la Figura 5.28 (c).

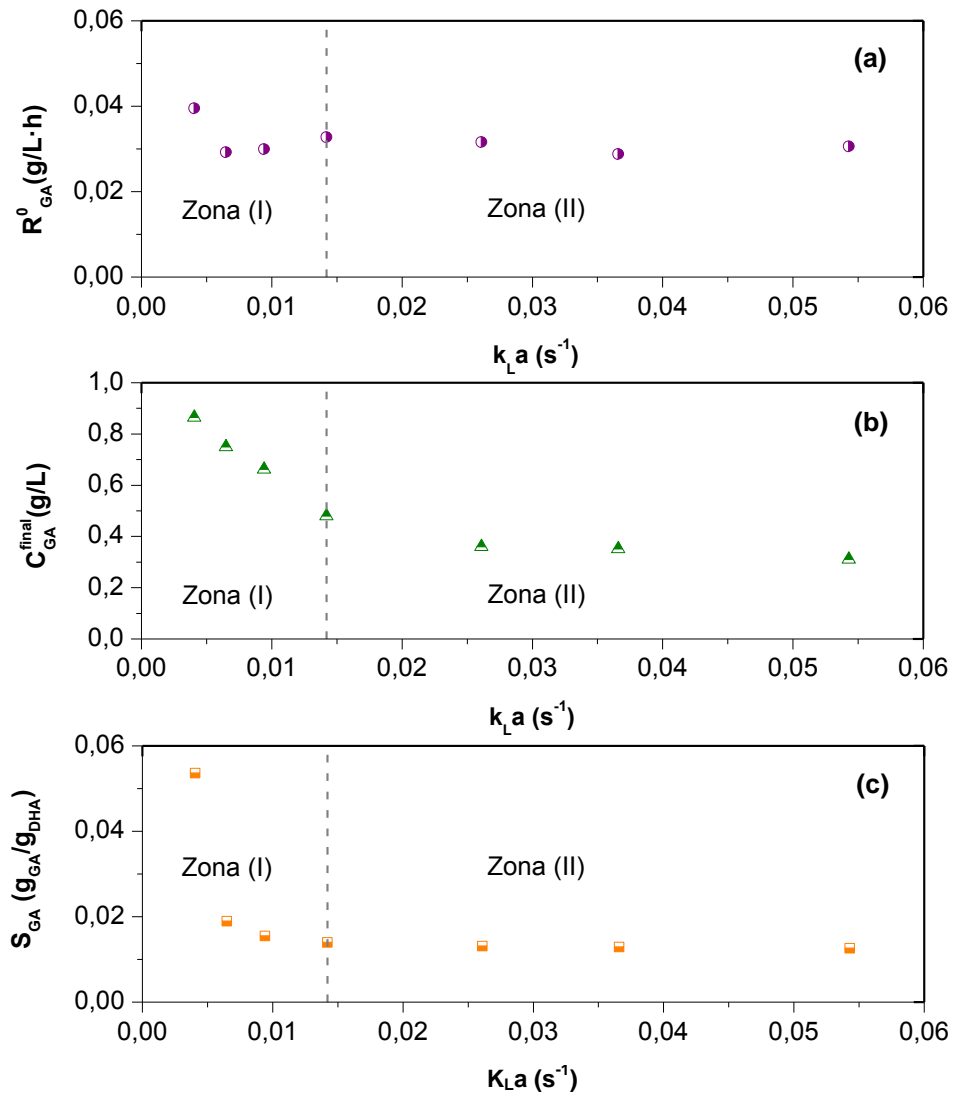


Figura 5.28. Influencia de $k_L a$ sobre la velocidad inicial de producción de ácido glicérico (R_{GA}^0), sobre su concentración final (C_{GA}^{final}) y la selectividad (S_{GA}).

5.3 BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Bauer, R., Katsikis, N., Varga, S., Hekmat, D. 2005. Study of the inhibitory effect of the product dihydroxyacetone on *Gluconobacter oxydans* in a semi-continuous two-stage repeated-fed-batch process. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, **28**(1), 37-43.
- Cassidy, M.B., Lee, H., Trevors, J.T. 1996. Environmental applications of immobilized microbial cells: A review. *Journal of Industrial Microbiology*, **16**(2), 79-101.
- Deppenmeier, U., Hoffmeister, M., Prust, C. 2002. Biochemistry and biotechnological applications of *Gluconobacter* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **60**(3), 233-242.
- Doran, P.M. 2013. Chapter 10 - mass transfer. in: *Bioprocess engineering principles (second edition)*, Academic Press. London, pp. 379-444.
- García-Ochoa, F., Escobar, S., Gómez, E. 2015. Specific oxygen uptake rate as indicator of cell response of *Rhodococcus erythropolis* cultures to shear effects. *Chemical Engineering Science*, **122**, 491-499.
- García-Ochoa, F., Gómez, E. 2009. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. *Biotechnology Advances*, **27**(2), 153-176.
- García-Ochoa, F., Gómez, E. 2004. Theoretical prediction of gas-liquid mass transfer coefficient, specific area and hold-up in sparged stirred tanks. *Chemical Engineering Science*, **59**(12), 2489-2501.
- García-Ochoa, F., Gómez, E., Santos, V.E., Merchuk, J.C. 2010. Oxygen uptake rate in microbial processes: An overview. *Biochemical Engineering Journal*, **49**(3), 289-307.
- García-Ochoa, F., Santos, V.E., Gómez, E. 2011. 2.15 - stirred tank bioreactors A2 - moo-young, murray. in: *Comprehensive biotechnology (second edition)*, Academic Press. Burlington, pp. 179-198.

- Hu, Z.-C., Zheng, Y.-G., Shen, Y.-C. 2011. Use of glycerol for producing 1,3-dihydroxyacetone by *Gluconobacter oxydans* in an airlift bioreactor. *Bioresource Technology*, **102**(14), 7177-7182.
- Karimi, A., Golbabaie, F., Mehrnia, M.R., Neghab, M., Mohammad, K., Nikpey, A., Pourmand, M.R. 2013. Oxygen mass transfer in a stirred tank bioreactor using different impeller configurations for environmental purposes. *Iranian journal of environmental health science & engineering*, **10**(1), 1.
- Martín, M., Montes, F.J., Galán, M.A. 2008. Bubbling process in stirred tank reactors I: Agitator effect on bubble size, formation and rising. *Chemical Engineering Science*, **63**(12), 3212-3222.
- Oosterhuis, N., Groesbeek, N., Kossen, N., Schenk, E. 1985. Influence of dissolved oxygen concentration on the oxygen kinetics of *Gluconobacter oxydans*. *Applied microbiology and biotechnology*, **21**(1-2), 42-49.
- Svitel, J., Sturdik, E. 1994. Product yield and by-product formation in glycerol conversion to dihydroxyacetone by *Gluconobacter oxydans*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **78**(5), 351-355.
- Torres López, A.M., Quintero Díaz, J.C., Atehortúa Garcés, L. 2008. Determination of the specific oxygen uptake rate in microorganisms including electrode time response. *Rev. Fac. Ing. Univ. Antioquia*, **43**, 33-41.
- Ulbrecht, J.J., Patterson, G.K. 1985. *Mixing of liquids by mechanical agitation*. Taylor & Francis.
- Van't Riet, K. 1983. Mass transfer in fermentation. *Trends in Biotechnology*, **1**(4), 113-119.
- Zheng, X.-j., Jin, K.-q., Zhang, L., Wang, G., Liu, Y.-P. 2016. Effects of oxygen transfer coefficient on dihydroxyacetone production from crude glycerol. *brazilian journal of microbiology*, **47**(1), 129-135.

CAPÍTULO 6.

MODELO CINÉTICO DEL PROCESO EN *RESTING* *CELLS*

CAPÍTULO 6

MODELO CINÉTICO DEL PROCESO EN RESTING CELLS

Índice

6.1	MODELO CINÉTICO EN <i>ERLENMEYER</i> -INCUBADORA ORBITAL ..	290
6.2	MODELO CINÉTICO EN BIORREACTOR TANQUE AGITADO	305
6.2.1	Cinética controlada por la biotransformación.....	305
6.2.2	Cinética controlada por la transferencia de oxígeno.....	309
6.3	BIBLIOGRAFÍA CITADA.....	314

CAPÍTULO 6

MODELO CINÉTICO DEL PROCESO EN *RESTING CELLS*

La formulación de un modelo cinético capaz de describir la evolución con el tiempo de los compuestos involucrados en el proceso presenta una gran importancia en el campo de la Biotecnología Industrial, ya que estos modelos permiten predecir el comportamiento del sistema, lo que resulta imprescindible para el desarrollo del proceso, la elección y diseño del biorreactor, su control en operación y el cambio de escala. Además, este aspecto es de gran utilidad pues posibilita la optimización mediante simulación del proceso productivo, ahorrando tiempo, esfuerzo y recursos destinados a experimentación (Almquist y col., 2014).

Según Nielsen y Villadsen (1992), un modelo cinético está compuesto por una serie de ecuaciones que relacionan las velocidades de producción y consumo con las concentraciones de productos y reactivos y que, integradas en un balance de materia, permiten la predicción de la conversión del sustrato y del rendimiento de cada producto, así como de su concentración final, en unas condiciones de operación dadas.

Los modelos cinéticos pueden ser de tipo estructurado, si consideran las células como un sistema multicomponente (ribosomas, enzimas, membranas, proteínas, ácidos nucleicos, etc.), o de tipo no estructurado, donde todos los componentes celulares se representan como una única concentración, la concentración de biomasa. A su vez, se pueden clasificar en modelos segregados, en los cuales se considera que la población está compuesta por células de diferentes edades, o en modelos no segregados, que suponen que el comportamiento de la población se puede asemejar al de una célula promedio (Alcón, 1999).

En este Capítulo, se va a tratar de describir mediante ecuaciones cinéticas la evolución del proceso de producción de DHA en *resting cells*, puesto que es la forma más ventajosa de operar, como se ha comentado en el Capítulo anterior. Para ello, se va a proponer un modelo no estructurado-no segregado, por simplicidad, ya que el estudio en profundidad del metabolismo de la célula queda fuera del alcance de esta Tesis Doctoral. Además, este tipo de modelos son capaces de representar de manera

satisfactoria un vasto conjunto de procesos biológicos de interés (Ben Yahia y col., 2015).

En este caso, dado que la producción de ácido glicérico se puede considerar despreciable, ya que la selectividad es inferior a 0,06 g_{GA}/g_{DHA} (ver Figura 5.28 (c)), el oxígeno es un reactivo imprescindible para la producción de DHA (C₃H₆O₃) a partir de glicerol (C₃H₈O₃) y el proceso en *resting cells* implica que no hay crecimiento de la biomasa, la reacción biológica de interés puede representarse a través de la siguiente ecuación:



Con las simplificaciones anteriores, se puede abordar la formulación de un modelo cinético empírico para los experimentos en matraz *Erlenmeyer* y otro para los experimentos realizados en biorreactor tipo tanque agitado, ya que en este último caso se han observado fenómenos de influencia del oxígeno y de estrés hidrodinámico que no se detectaban o no se podían estudiar a pequeña escala y que podrían afectar al comportamiento cinético.

6.1 MODELO CINÉTICO EN *ERLENMEYER*-INCUBADORA ORBITAL

En este Apartado se va a plantear un modelo cinético para describir los experimentos realizados en *resting cells* en incubadora orbital con concentraciones de biomasa entre 0,1 y 1 g/L y para un intervalo de agitaciones en incubadora orbital entre 100 y 400 rpm (Tabla 5.16).

Para la formulación del modelo cinético es fundamental proponer un esquema de reacciones en el que intervengan las especies involucradas en el proceso. En este caso, únicamente se va a considerar la reacción de producción de DHA (r_1), ya que la producción de subproductos es despreciable. De acuerdo a la observación experimental realizada en Capítulos previos, la evolución de la concentración de los compuestos con el tiempo es lineal y, por lo tanto, la velocidad de la reacción es constante, pudiendo proponerse un modelo cinético de orden 0 de la siguiente forma:

$$r_1 = k \quad [6.2]$$

Las velocidades de producción de DHA y de consumo de glicerol pueden expresarse en función de la velocidad de reacción r_1 mediante las siguientes ecuaciones:

$$R_{DHA} = \frac{dC_{DHA}}{dt} = r_1 \quad [6.3]$$

$$R_{Glic} = -\frac{dC_{Glic}}{dt} = -\nu_G \cdot r_1 \quad [6.4]$$

Dado que los datos de los que se dispone son datos integrales (concentración-tiempo), el mejor procedimiento para determinar el valor de los parámetros es integrar las ecuaciones diferenciales [6.3] y [6.4] entre la concentración inicial y final, para poder ajustar el modelo propuesto a los datos experimentales y obtener así los parámetros correspondientes. Realizando dicha integración, se obtienen las expresiones [6.5] y [6.6], que describen una evolución lineal de la concentración con el tiempo.

$$C_{DHA} = k \cdot t \quad [6.5]$$

$$C_{Glic} = C_{Glic}^0 - \nu_G \cdot k \cdot t \quad [6.6]$$

Las ecuaciones [6.5] y [6.6] permiten el cálculo de la constante k y el coeficiente estequiométrico ν_G mediante una simple regresión lineal para cada experimento (ajuste en simple respuesta). Con estos datos, y aplicando las ecuaciones [6.2], [6.3] y [6.4], se puede calcular la velocidad de producción de DHA, la velocidad de consumo de glicerol y la velocidad de reacción para cada experimento.

En la Figura 6.1 se muestran las regresiones lineales realizadas para los datos de concentración de DHA-tiempo, mientras que en la Figura 6.2 se presentan las regresiones lineales de los datos de concentración de glicerol con el tiempo para cada experimento. Asimismo, en la Tabla 6.1 se muestran los valores obtenidos de k , ν_G , R_{DHA} y R_{Glic} para cada experimento. Cabe destacar que el valor de ν_G es prácticamente idéntico para todos los experimentos y que su inversa corresponde al rendimiento producto/sustrato ($Y_{P/S}$), según la ecuación [6.7]. De este modo, el valor medio de este coeficiente estequiométrico ($\overline{\nu_G} = 1,04$) indica un rendimiento a DHA del 96 %, validando la suposición inicial acerca de que la producción de subproducto es despreciable.

$$Y_{P/S}(\%) = \frac{1}{\nu_G} \cdot 100 \quad [6.7]$$

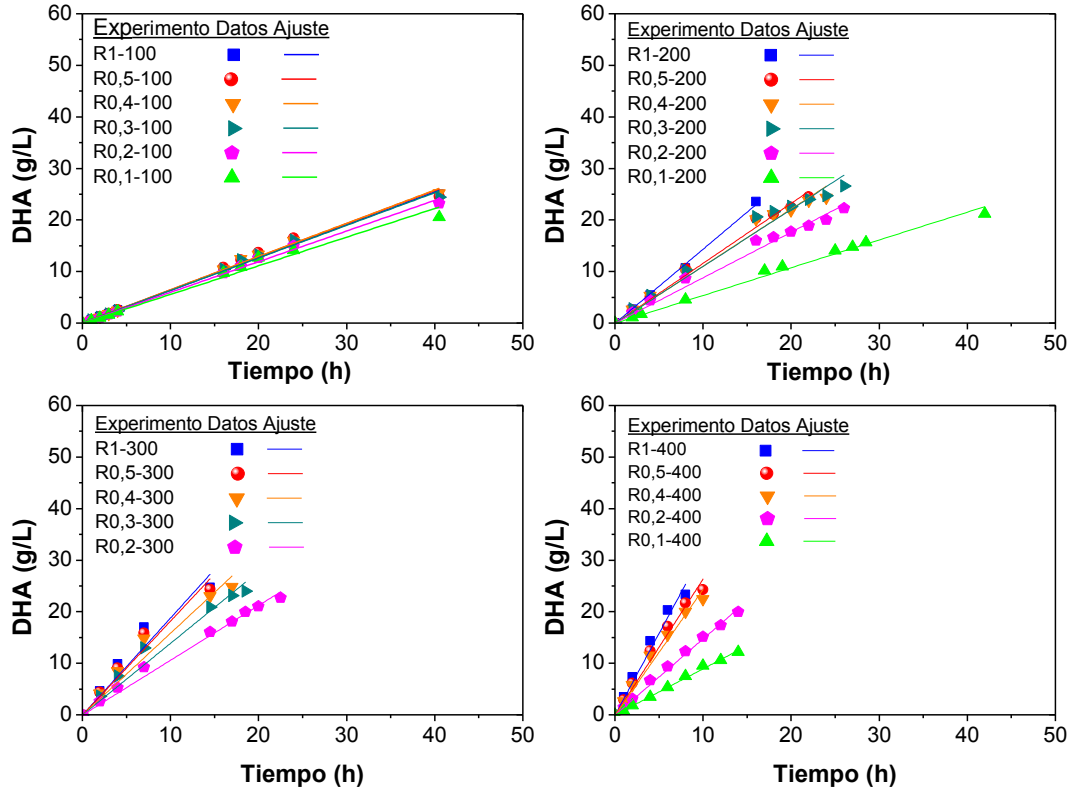


Figura 6.1. Evolución de la concentración de DHA con el tiempo para los experimentos con células en estado de resting cells realizados en incubadora orbital. Las líneas representan el ajuste de los datos a la ecuación [6.3].

Además, en la Tabla 6.1 se observa que las velocidades de producción varían tanto con la agitación, como con la concentración de biomasa. En el primer caso, esta variación se debe a que el bioproceso se lleva a cabo con consumo de oxígeno, como así lo refleja la estequiometría propuesta en la ecuación [6.1]. Por lo tanto, la velocidad de producción de DHA puede estar controlada por la velocidad de consumo de oxígeno (OUR). Si se hace esta suposición, se puede plantear la siguiente relación entre ambas:

$$r = \frac{R_{DHA}}{v_{DHA}} = \frac{OUR}{v_{O_2}} \therefore R_{DHA} = \frac{v_{DHA}}{v_{O_2}} \cdot OUR = Y_{DHA,O_2} \cdot OUR \quad [6.8]$$

De este modo, al considerar que la velocidad de consumo está limitada por el aporte de oxígeno, se puede asumir que la concentración de oxígeno disuelto en el caldo es despreciable (ya que no se dispone de este dato en matraz *Erlenmeyer*). Entonces, se debe cumplir la ecuación [6.9] procedente del balance de oxígeno en la fase líquida (ecuación [5.6]).

$$OTR = OUR \quad [6.9]$$

Sustituyendo la ecuación [6.9] en la ecuación [6.8], teniendo en cuenta la definición de OTR, se obtiene la siguiente igualdad:

$$R_{DHA} = Y_{DHA,O_2} \cdot OTR = Y_{DHA,O_2} \cdot k_L a \cdot (C_{O_2}^* - C_{O_2}) \quad [6.10]$$

Dado que se ha realizado la suposición de que la concentración de oxígeno disuelto en el caldo es despreciable con respecto a su valor de saturación, la ecuación [6.10] queda simplificada a la ecuación [6.11].

$$R_{DHA} = Y_{DHA,O_2} \cdot k_L a \cdot C_{O_2}^* \quad [6.11]$$

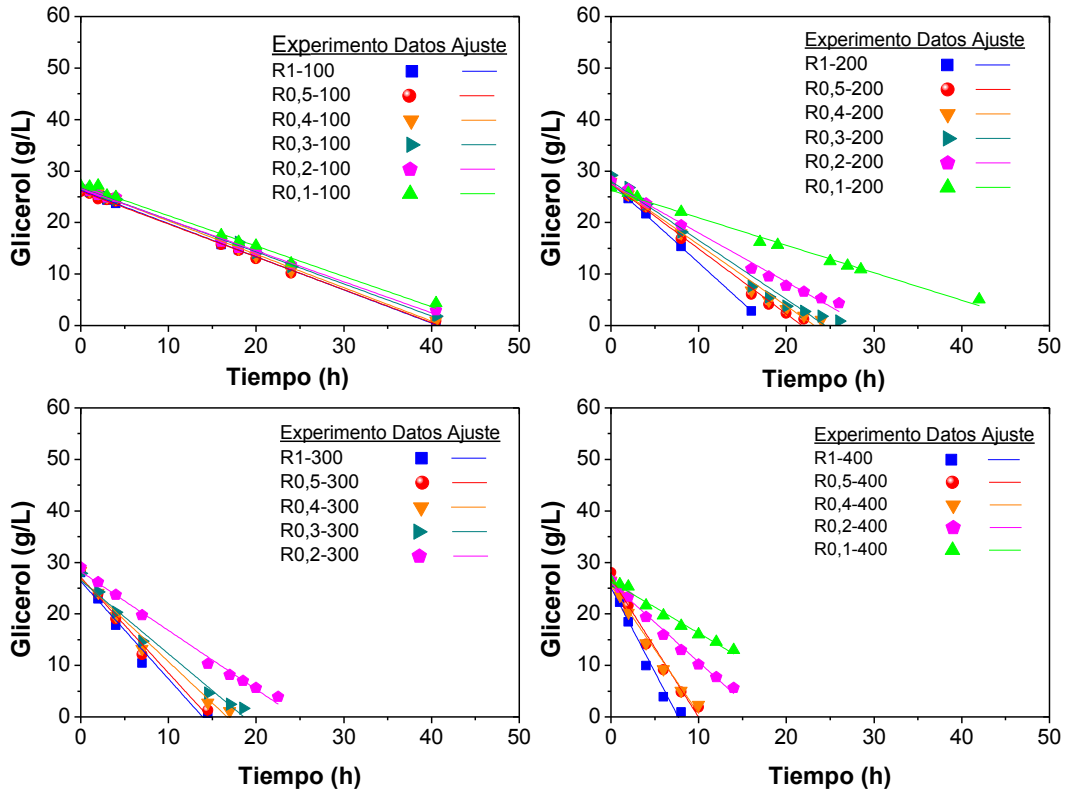


Figura 6.2. Evolución de la concentración de glicerol con el tiempo para los experimentos con células en estado de resting cells realizados en incubadora orbital. Las líneas representan el ajuste de los datos a la ecuación [6.4].

Tabla 6.1. Velocidades de producción y velocidad de reacción calculada para cada uno de los experimentos (ajustes en simple respuesta).

Experimento	N (rpm)	$k_L a$ (s ⁻¹)	C_X (g/L)	R_{DHA} (g/L·h)	R_{Glic} (g/L·h)	r_1 (g _{DHA} /L·h)	v_G (g _{Glic} /g _{DHA})	r^2
R1-100	100	0,0073	1	0,64	-0,65	0,64	1,03	0,99
R0,5-100			0,5	0,64	-0,65	0,64	1,01	0,97
R0,4-100			0,4	0,65	-0,66	0,65	1,02	0,98
R0,3-100			0,3	0,63	-0,64	0,63	1,02	0,99
R0,2-100			0,2	0,60	-0,61	0,60	1,02	0,99
R0,1-100			0,1	0,50	-0,52	0,50	1,04	0,99
R1-200	200	0,0135	1	1,44	-1,50	1,44	1,04	0,99
R0,5-200			0,5	1,19	-1,26	1,19	1,06	0,98
R0,4-200			0,4	1,22	-1,24	1,22	1,01	0,98
R0,3-200			0,3	1,10	-1,15	1,10	1,04	0,97
R0,2-200			0,2	0,88	-0,92	0,88	1,05	0,99
R0,1-200			0,1	0,52	-0,53	0,52	1,03	0,99
R1-300	300	0,0193	1	1,88	-1,89	1,88	1,01	0,98
R0,5-300			0,5	1,82	-1,86	1,82	1,02	0,98
R0,4-300			0,4	1,59	-1,61	1,59	1,01	0,98
R0,3-300			0,3	1,39	-1,43	1,39	1,03	0,97
R0,2-300			0,2	1,06	-1,14	1,06	1,08	0,98
R1-400	400	0,0248	1	3,17	-3,27	3,17	1,03	0,99
R0,5-400			0,5	2,64	-2,7	2,64	1,02	0,99
R0,4-400			0,4	2,09	-2,48	2,09	1,19	0,98
R0,2-400			0,2	1,48	-1,54	1,48	1,04	0,98
R0,1-400			0,1	0,90	-1,00	0,90	1,12	0,99

La ecuación anterior indica que si la suposición realizada es correcta, la velocidad de producción de DHA (Tabla 6.1) debe ser proporcional al coeficiente volumétrico de transporte de oxígeno. Esta relación puede constatar en la Figura 6.3 que, a su vez, permite el cálculo del coeficiente Y_{DHA,O_2} a partir de las pendientes de las rectas para cada concentración de biomasa (Tabla 6.2). Cabe matizar que los ajustes se han realizado forzando la ordenada en el origen en el 0,0 para poder comprobar la hipótesis establecida en la ecuación [6.11].

Una vez obtenidas las pendientes, se ha calculado Y_{DHA,O_2} considerando un valor de $C_{O_2}^*$ de 8,05 mg/L (Doran, 2013). En la Tabla 6.2, se observa claramente que el coeficiente Y_{DHA,O_2} es función de la concentración de biomasa. La relación entre ambos parece ser hiperbólica, tal y como muestra la Figura 6.4. De este modo, ajustando la

ecuación [6.12] a los datos de la Figura 6.4, se obtienen los parámetros de ajuste que se muestran en la Tabla 6.3.

$$Y_{DHA,O_2} = \frac{Y_{DHA,O_2}^{máx} \cdot C_X}{k_X + C_X} \quad [6.12]$$

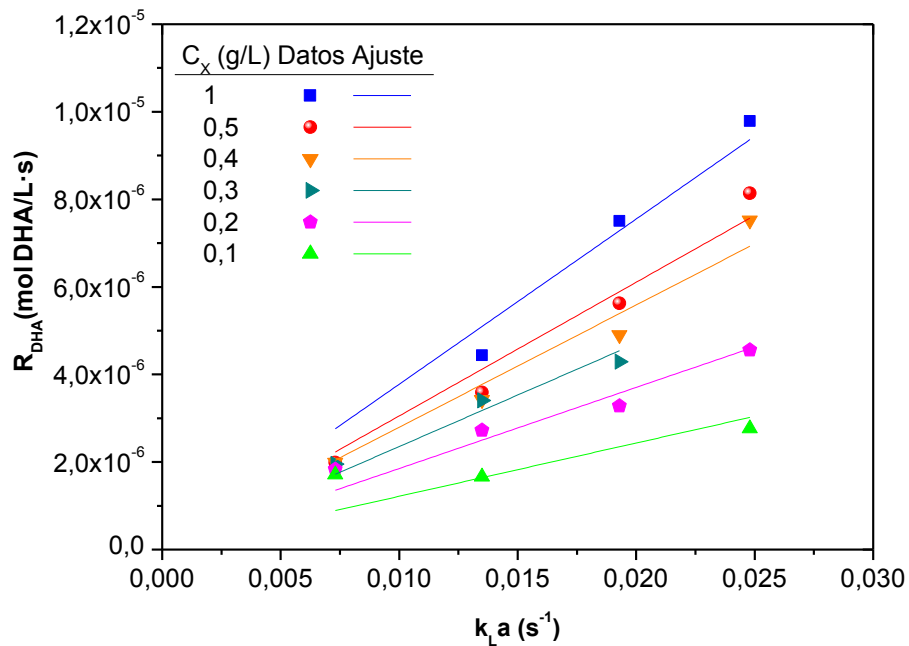


Figura 6.3. Relación entre la velocidad de producción de DHA y el coeficiente volumétrico de transporte de oxígeno ($k_L a$).

Tabla 6.2. Resultados de los ajustes lineales de los datos de la Figura 6.3 y evolución del rendimiento Y_{DHA,O_2} en función de la concentración de biomasa.

C_X (g/L)	Y_{DHA,O_2} (mol DHA/mol O_2)	r^2
1	1,50	0,990
0,5	1,21	0,991
0,4	1,11	0,990
0,3	0,94	0,993
0,2	0,74	0,988
0,1	0,48	0,916

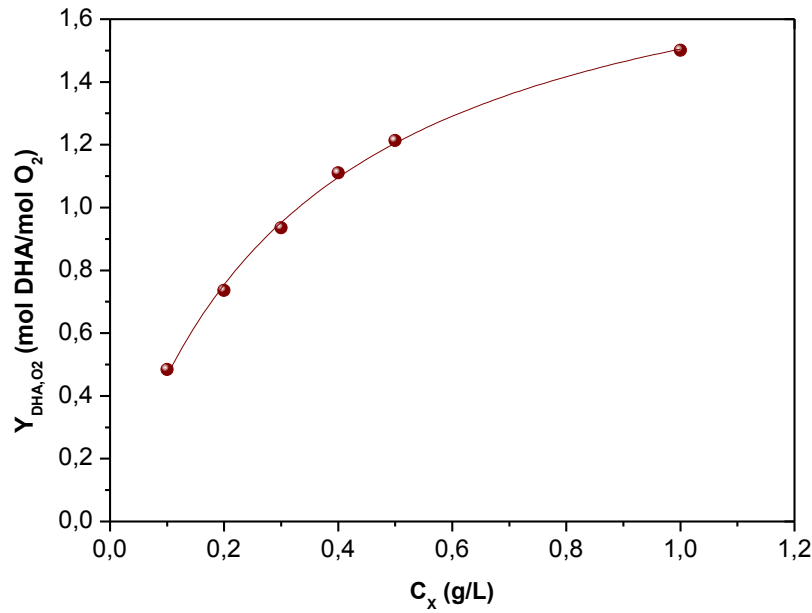


Figura 6.4. Influencia de la concentración de biomasa sobre el rendimiento Y_{DHA,O_2} .

Tabla 6.3. Parámetros de ajuste de la ecuación [6.12].

k_x (g _x /L)	$Y_{DHA,O_2}^{máx.}$ (mol _{DHA} /molO ₂)	r^2
$0,33 \pm 0,02$	$2,00 \pm 0,04$	0,998

Cabe destacar que el valor del rendimiento de moles de DHA por mol de oxígeno consumido predicho por la ecuación [6.12] ($Y_{DHA,O_2}^{máx.}$) presenta un valor de 2 mol_{DHA}/molO₂, que se corresponde con el valor teórico marcado por la estequiometría de la reacción planteada en la ecuación [6.1].

Con la información obtenida, se puede formular un modelo cinético basado en la hipótesis de que la etapa controlante es la velocidad de transferencia de oxígeno y, por tanto, la velocidad de consumo de oxígeno depende de ella. Para plantear el modelo, se ha sustituido la expresión [6.12] en la ecuación [6.11]. De este modo, la velocidad de producción de DHA queda definida por la siguiente ecuación:

$$R_{DHA} = \frac{Y_{DHA,O_2}^{máx.} \cdot C_x}{k_x + C_x} \cdot k_L a \cdot C_{O_2}^* \quad [6.13]$$

Asimismo, sustituyendo la ecuación [6.13] en la ecuación [6.3] se obtiene una expresión para la velocidad de reacción, que introducida en la ecuación [6.4] proporciona la velocidad de consumo de glicerol, quedando como sigue:

$$R_{Glic} = -\nu_G \cdot \frac{Y_{DHA,O_2}^{máx.} \cdot C_X}{k_X + C_X} \cdot k_L a \cdot C_{O_2}^* \quad [6.14]$$

Realizando un ajuste en múltiple respuesta (con todos los experimentos a la vez) de las ecuaciones [6.13] y [6.14] mediante el método de las velocidades de producción (García-Ochoa y col., 1992), se obtienen los parámetros que se muestran en la Tabla 6.4.

Tabla 6.4. Valores de los parámetros de ajuste y de los parámetros estadísticos obtenidos tras el ajuste en múltiple respuesta para los experimentos en matraz Erlenmeyer.

Parámetros de ajuste		Parámetros estadísticos	
Parámetro	Valor	Parámetro	Valor
ν_G (gGlic/gDHA)	$1,09 \pm 0,02$	VE (%)	93,6
$Y_{DHA,O_2}^{máx.}$ (gDHA/gO ₂)	$4,11 \pm 0,10$	F-Fischer	6627
k_X (gX/L)	$0,17 \pm 0,01$	ERMC	2,24

Como puede observarse en dicha tabla, el valor del ERMC es bajo, indicando pocas discrepancias entre los valores experimentales y los predichos por el modelo. Además, el porcentaje de variación explicada está próximo al 100%, indicando un alto poder explicativo del modelo. Por último, el valor de la F-Fisher es muy superior al valor tabulado para el 95% de confianza (19,5); por lo que, el modelo se ajusta muy bien a los datos experimentales.

Las Figuras 6.5 a 6.8 muestran la comparativa entre los valores experimentales y los valores predichos por el modelo. Como puede apreciarse, el modelo propuesto, con los parámetros obtenidos por ajuste de todos los datos experimentales recogidos en las citadas figuras, reproduce muy adecuadamente la gran mayoría de los experimentos llevados a cabo, presentando una desviación significativa en la reproducción de los datos experimentales de uno de ellos (de un total de veintidós), realizado con 0,1 g/L de biomasa y a una agitación de 100 rpm.

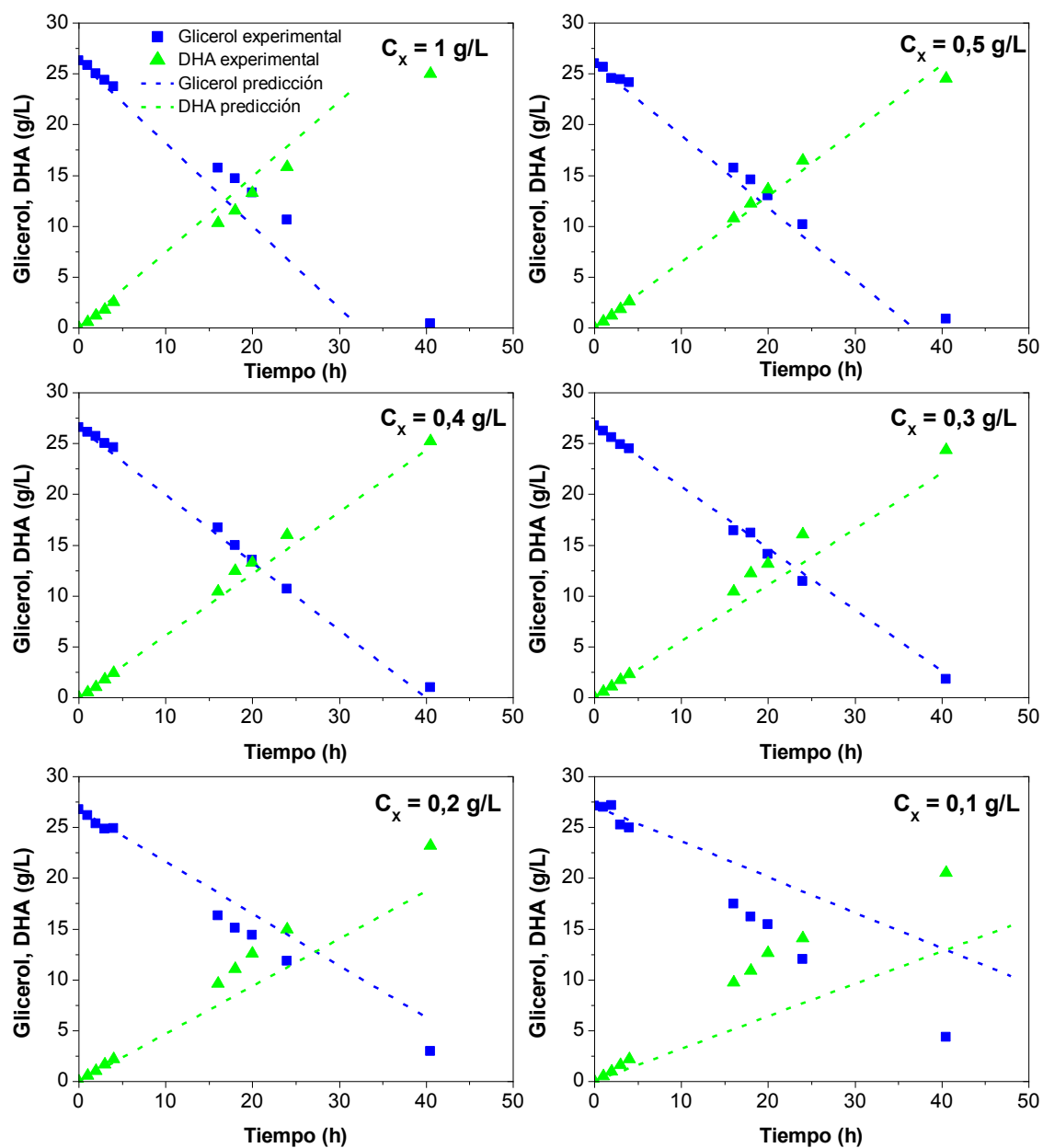


Figura 6.5. Comparación entre los valores experimentales y predichos por el modelo cinético propuesto para los experimentos con distinta concentración de células en estado de resting cells realizados en matraz Erlenmeyer y agitados en incubadora orbital a 100 rpm.

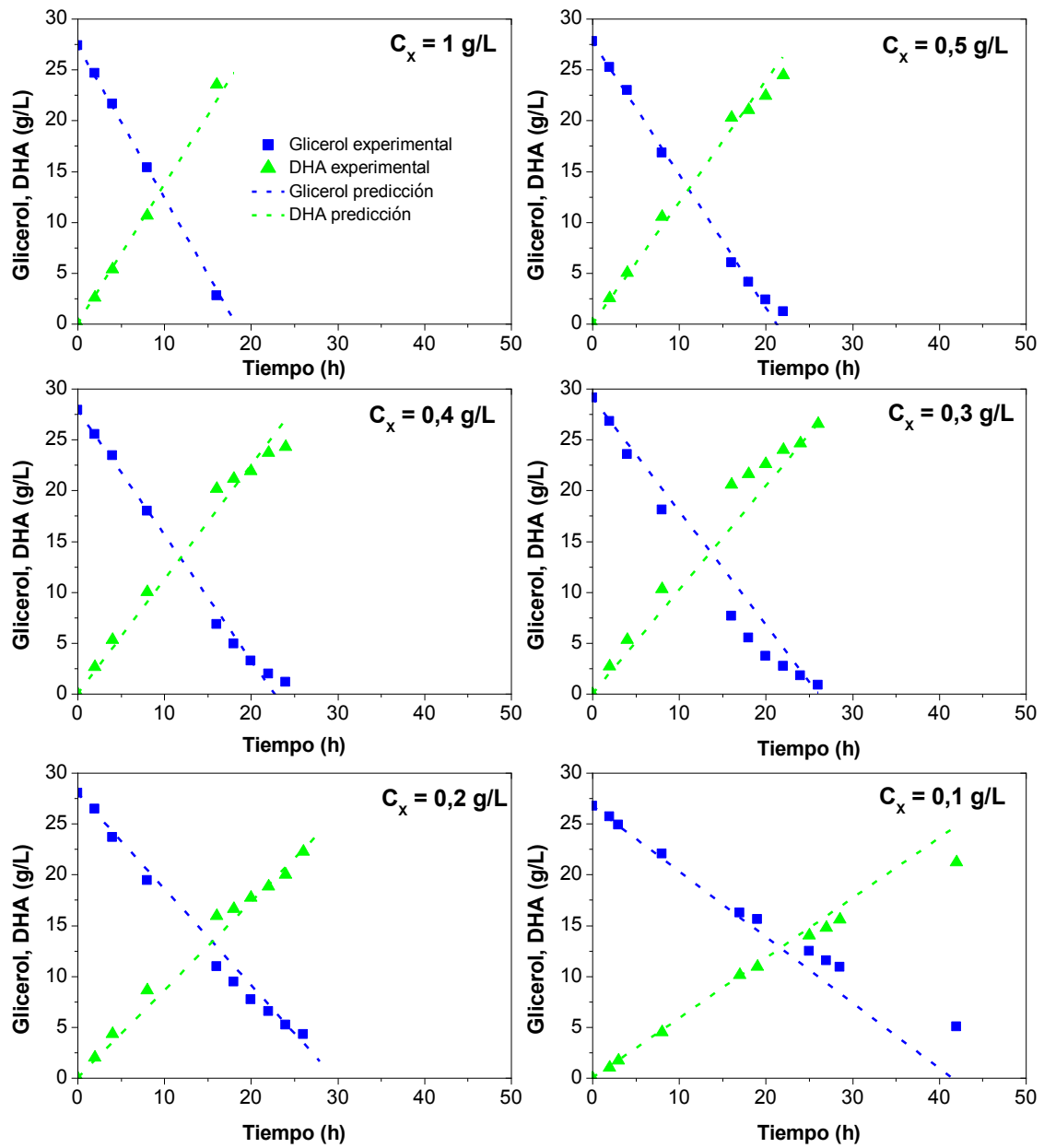


Figura 6.6. Comparación entre los valores experimentales y predichos por el modelo cinético propuesto para los experimentos con distinta concentración de células en estado de resting cells realizados en matraz Erlenmeyer y agitados en incubadora orbital a 200 rpm.

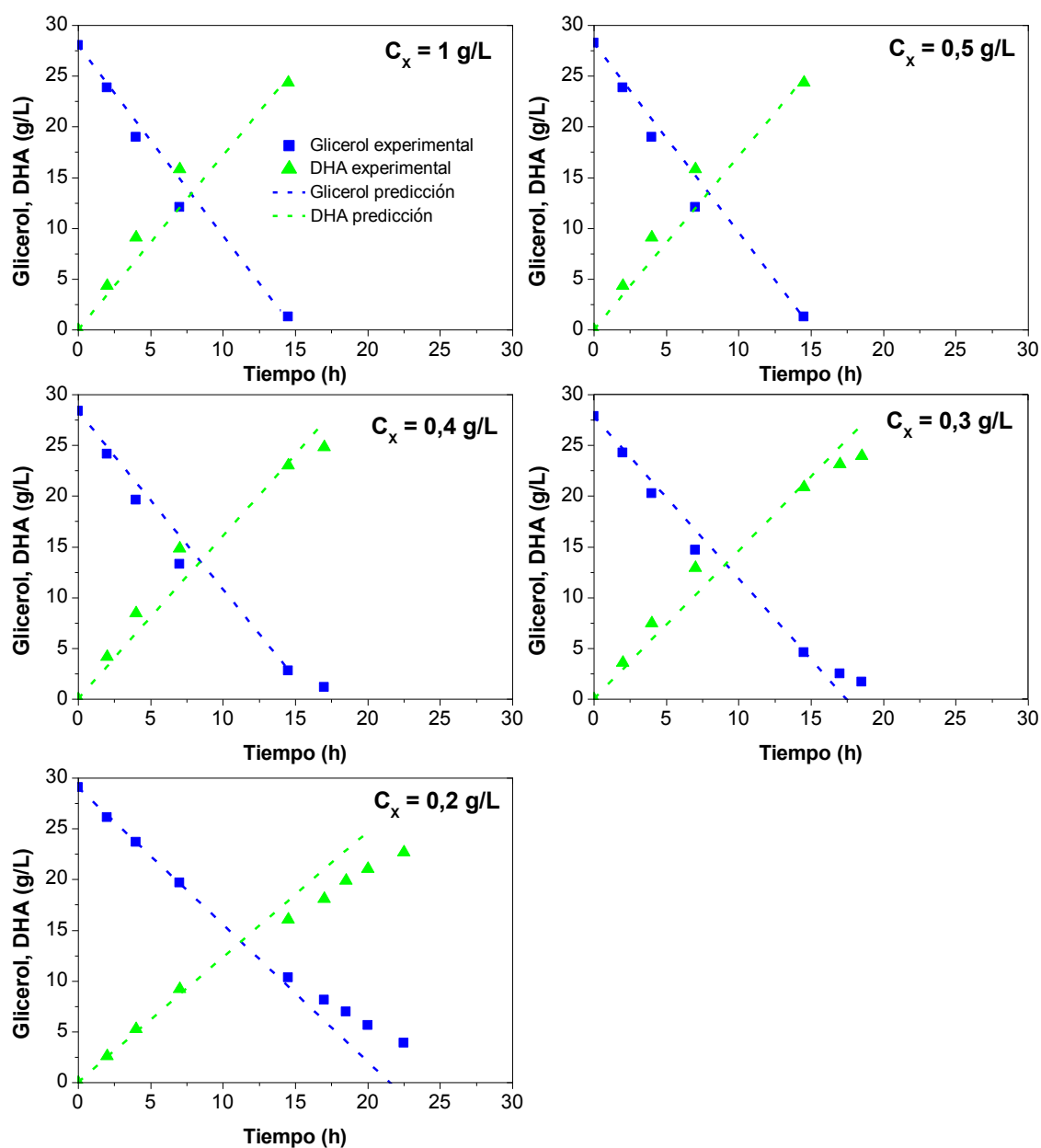


Figura 6.7. Comparación entre los valores experimentales y predichos por el modelo cinético propuesto para los experimentos con distinta concentración de células en estado de resting cells realizados en matraz Erlenmeyer y agitados en incubadora orbital a 300 rpm.

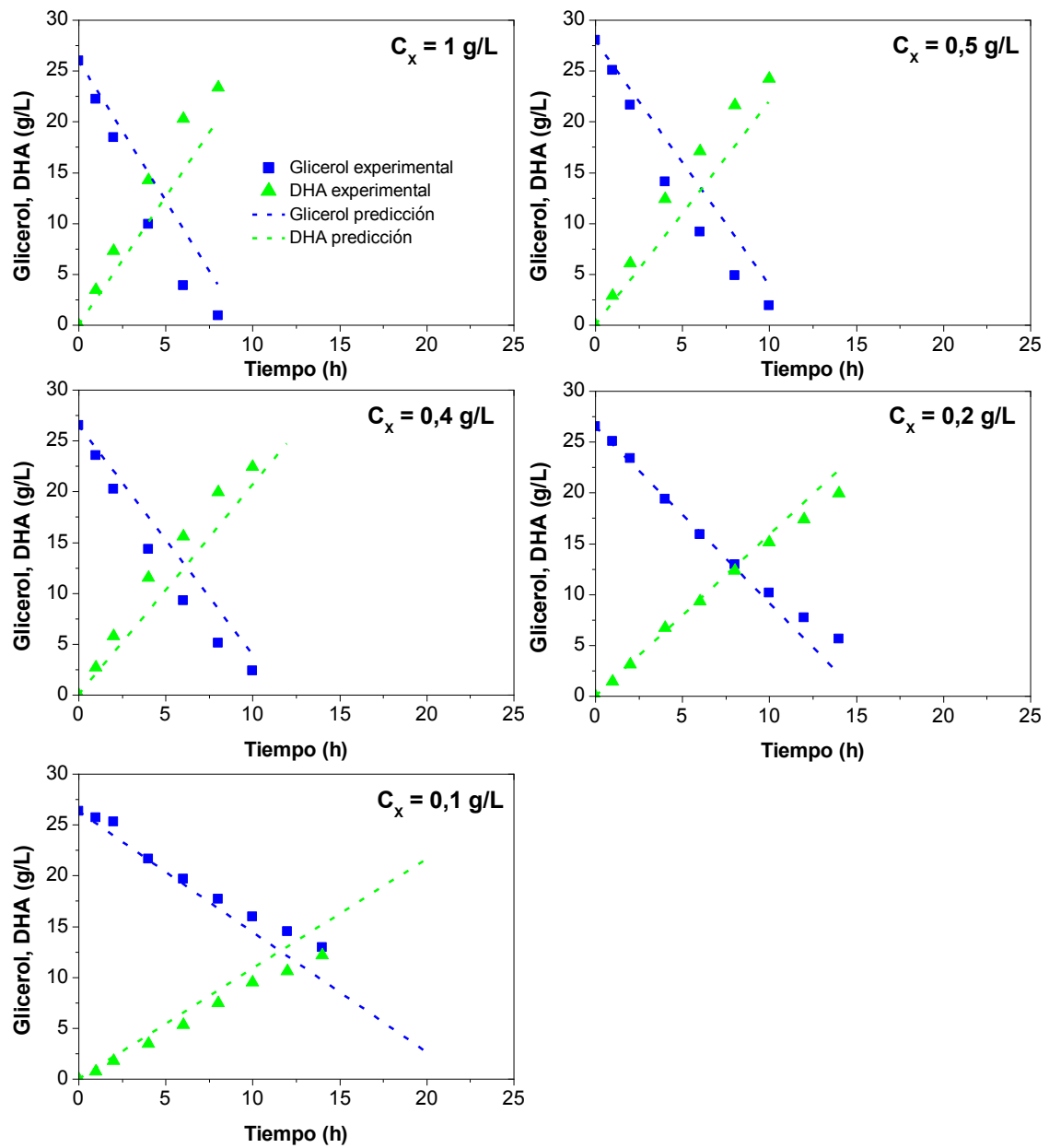


Figura 6.8. Comparación entre los valores experimentales y predichos por el modelo cinético propuesto para los experimentos con distinta concentración de células en estado de resting cells realizados en matraz Erlenmeyer y agitados en incubadora orbital a 400 rpm.

Por último, se ha realizado un análisis de residuos calculando el error relativo (Er) mediante la ecuación [6.15] y observando su evolución con el tiempo (Figura 6.9). De esta manera, se puede comprobar que el error se distribuye de manera homogénea en torno al 0 y que casi todos los experimentos se encuentran dentro del área sombreada, correspondiente a errores inferiores al 20%. Sin embargo, fuera del área sombreada, el experimento R0,1-100 presenta desviaciones importantes, tal y como se ha comentado previamente al observar la Figura 6.5. Esto puede ser debido a que en este experimento (dada la agitación y la biomasa empleadas) no se cumpla la suposición de que la etapa controlante sea el transporte de oxígeno. No obstante, dado el elevado número de experimentos que se han considerado para realizar el ajuste, estas desviaciones no condicionan en absoluto la validez del modelo propuesto, ya que es capaz de simular el 95% de los experimentos realizados en matraz *Erlenmeyer* con células en *resting cells* de una manera fiable, tal y como demuestran los parámetros estadísticos de la Tabla 6.4.

$$Er = \frac{C_{DHA}^{exp} - C_{DHA}^{teor}}{C_{DHA}^{exp}} \quad [6.15]$$

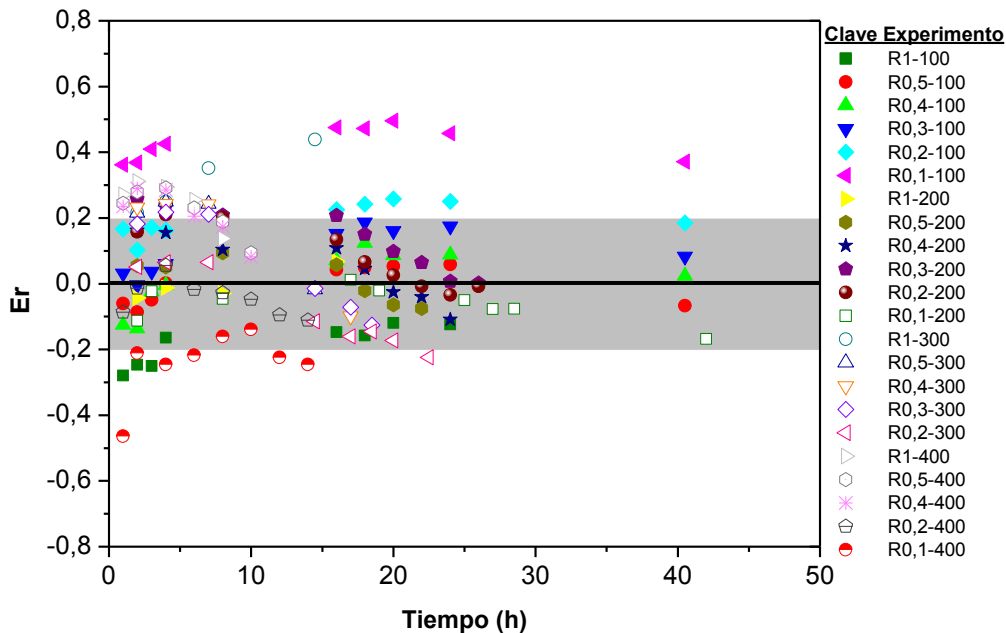


Figura 6.9. Análisis del error relativo obtenido en la predicción realizada con el modelo propuesto (ecuaciones [6.12] y [6.13]) para los experimentos realizados en matraz Erlenmeyer.

En cuanto al coeficiente $Y_{DHA,O_2}^{máx.}$ obtenido tras el ajuste en múltiple respuesta, presenta un valor de 1,46 mol_{DHA}/molO₂ (Tabla 6.4), lo que representa un 73 % del valor teórico mostrado en la estequiometría de la reacción [6.1]. Este dato confirma la hipótesis inicial: que los experimentos realizados en matraz *Erlenmeyer* están controlados cinéticamente por la transferencia de oxígeno y, por ello, la cantidad de DHA producida por mol de oxígeno consumido es inferior a la teórica.

Analizando los valores de k_{La} de los experimentos llevados a cabo en matraz *Erlenmeyer* (Tabla 6.1), se observa que para agitaciones superiores a 300 rpm k_{La} es superior a 0,0142 s⁻¹, que es el valor crítico determinado en el Apartado 5.2 a partir del cual deja de haber limitación al transporte de oxígeno para una concentración de biomasa de 0,5 g/L. En la Tabla 6.5 se recogen los valores de k_{La} obtenidos para los experimentos en biorreactor y en matraz con idéntica concentración de biomasa (0,5 g/L). Estos valores aparecen ordenados de menor a mayor y aquéllos superiores a 0,0142 s⁻¹ se muestran separados por una línea horizontal para señalar que estos experimentos no deberían estar controlados por la velocidad de transferencia de oxígeno, de acuerdo con lo explicado en el Capítulo 5. Sin embargo, los experimentos en matraz R0,5-300 y R0,5-400 están claramente limitados por la transferencia de oxígeno, como así lo indica el modelo cinético propuesto, pero presentan un valor de k_{La} algo mayor del que correspondería a esta situación.

Tabla 6.5. Valores de k_{La} de los experimentos en resting cells realizados en matraz *Erlenmeyer* y biorreactor con una concentración de biomasa de 0,5 g/L.

Experimento	Dispositivo	Agitación (rpm)	k_{La} (s ⁻¹)	Limitación por O ₂
B-300	Biorreactor	300	0,0041	Sí
B-360	Biorreactor	360	0,0065	Sí
R0,5-100	Matraz	100	0,0073	Sí
B-420	Biorreactor	420	0,0094	Sí
R0,5-200	Matraz	200	0,0135	Sí
B-560	Biorreactor	560	0,0142	No
R0,5-300	Matraz	300	0,0193	Sí
R0,5-400	Matraz	400	0,0248	Sí
B-650	Biorreactor	650	0,0261	No
B-750	Biorreactor	750	0,0366	No
B-900	Biorreactor	900	0,0543	No

Por otro lado, a los valores de k_{La} obtenidos en biorreactor se les puede atribuir una mayor fiabilidad que a los valores obtenidos en matraz, ya que los primeros se han determinado tanto teóricamente, mediante el método predictivo descrito en el Apartado 2.5.1, como experimentalmente, planteando un balance de materia de oxígeno en la fase gas según se describe en el Apartado 2.5.2 (sin grandes discrepancias en los valores calculados), mientras que los segundos se han determinado por medio de una ecuación empírica tomada de bibliografía y desarrollada para otro sistema. Por lo tanto, la Tabla 6.5 indica que los valores de k_{La} de los experimentos en matraz están sobreestimados. Probablemente, la causa radica en que la ecuación empírica empleada para su estimación (ecuación [4.1]) no contempla la resistencia adicional al transporte de oxígeno que supone la presencia del tapón de algodón colocado en la boquilla del matraz *Erlenmeyer* para asegurar esterilidad (Schultz, 1964).

Según el modelo planteado (ecuación [6.13]), la velocidad de producción de DHA depende exclusivamente de la concentración de biomasa y de k_{La} cuando controla la velocidad de transferencia de oxígeno. Por lo tanto, bajo esta situación, para una misma velocidad de producción de DHA y una misma concentración de biomasa, independientemente del dispositivo utilizado, el valor de k_{La} también debe ser idéntico. Estableciendo dicha relación entre matraz y biorreactor, se concluye que el valor de k_{La} para matraz debería ser 1,7 veces inferior al valor estimado mediante la ecuación empírica [4.1]. De este modo, los valores de k_{La} para los experimentos en matraz serían consistentes con los valores obtenidos en biorreactor en términos de velocidad de producción de DHA, como se puede observar en la Figura 6.10.

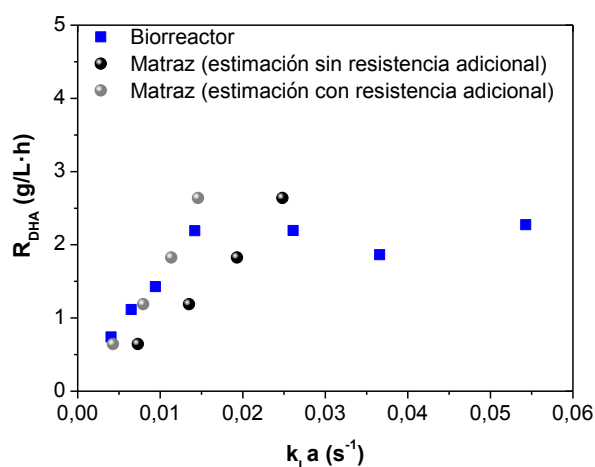


Figura 6.10. Velocidad de producción frente al valor de k_{La} para los experimentos en biorreactor y en matraz sin considerar la resistencia adicional del tapón de algodón y considerando la misma.

6.2 MODELO CINÉTICO EN BIORREACTOR TANQUE AGITADO

En el Apartado 5.2 se realizó un estudio en biorreactor tipo tanque agitado de los requerimientos de oxígeno del microorganismo en *resting cells* para llevar a cabo este bioproceso y se observó que para valores de $k_L a$ inferiores a $0,0142 \text{ s}^{-1}$ ($N < 560 \text{ rpm}$) y $C_X = 0,5 \text{ g/L}$, la velocidad global del proceso está controlada por la velocidad de transferencia de oxígeno, al igual que ocurre en los experimentos realizados en matraz *Erlenmeyer*, tal y como se ha demostrado en el Apartado 6.1. Sin embargo, en biorreactor puede ocurrir un fenómeno adicional que no se ha considerado en matraz *Erlenmeyer*: el estrés hidrodinámico que puede provocar que la concentración de células viables disminuya con el tiempo (Figura 5.26). Por este motivo, se ha decidido realizar un estudio cinético propio para los experimentos en biorreactor. No obstante, este estudio se ha dividido en dos Apartados, en función de la etapa limitante en el proceso. De este modo, se va a plantear un modelo cinético para los experimentos controlados por la biotransformación ($N > 560 \text{ rpm}$) y otro modelo distinto para los experimentos controlados por la transferencia de oxígeno ($N < 560 \text{ rpm}$). En la Figura 6.11 se presenta, a modo de recordatorio, la evolución de la concentración de glicerol, DHA y oxígeno disuelto con el tiempo para los experimentos realizados con las células en estado de *resting cells* en biorreactor tanque agitado (STBR). La observación de la evolución de la concentración de dichos compuestos con el tiempo es de gran utilidad para plantear las hipótesis necesarias para la formulación del modelo cinético más apropiado en cada caso.

6.2.1 Cinética controlada por la biotransformación

Los experimentos realizados a una agitación igual o superior a 560 rpm no están controlados por la transferencia de oxígeno, como así lo demuestra la Figura 5.23 del Capítulo 5, ya que los resultados experimentales no dependen de la agitación empleada en cada experimento. Por lo tanto, en este caso no se puede plantear un modelo como el del Apartado anterior, ya que la cinética no se ve afectada por el coeficiente de transporte de oxígeno. La principal diferencia entre los experimentos en los que controla la transferencia de oxígeno y aquellos en los que controla la reacción química es que en los primeros la velocidad del proceso no varía con el tiempo, responden a una cinética de orden 0, mientras que en los segundos se observa una clara disminución en la velocidad de consumo de sustrato a medida que éste se va agotando.

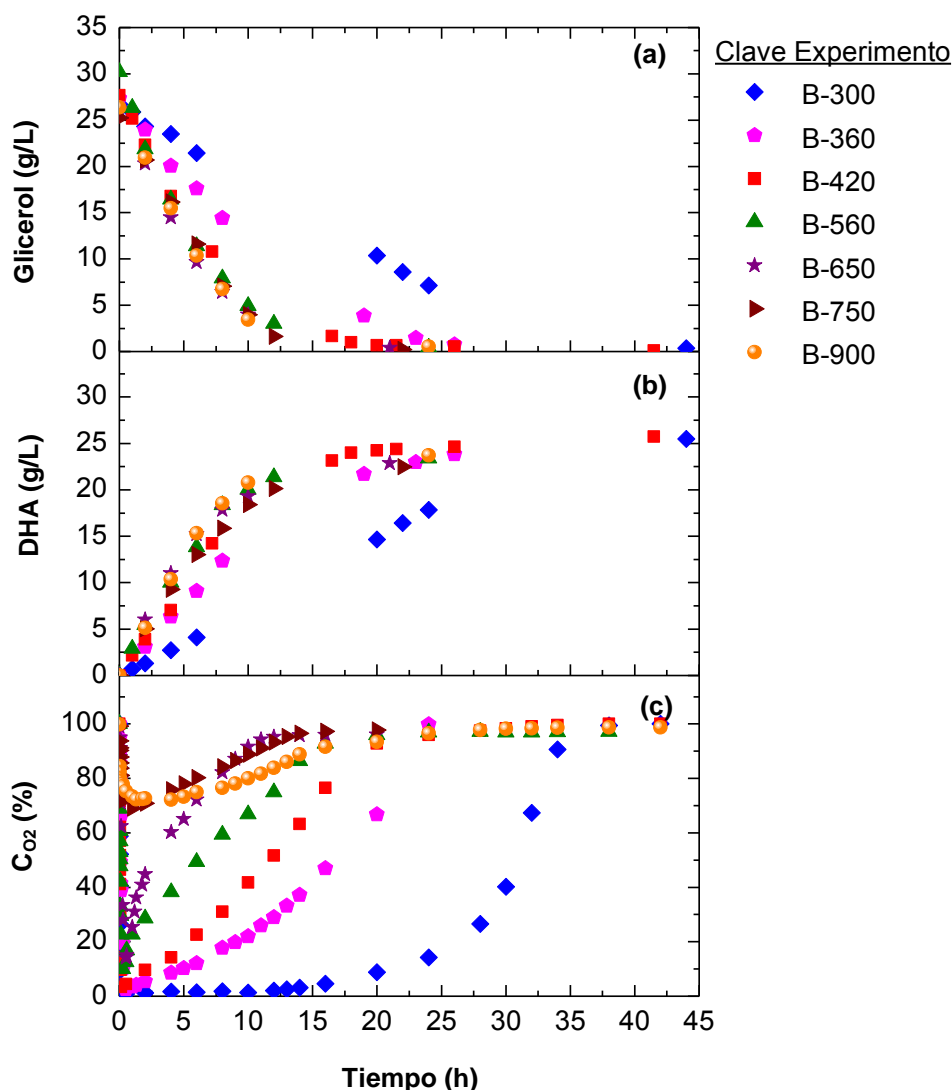


Figura 6.11. Evolución de la concentración de glicerol (a), DHA (b) y oxígeno disuelto (c) con el tiempo para los experimentos en resting cells realizados en biorreactor a distintas agitaciones.

Dado que la producción de DHA con *G. oxydans* en estado de *resting cells* puede asemejarse a un proceso enzimático, en el Capítulo 5 se empleó con éxito un modelo basado en la cinética de Michaelis-Menten, aunque adaptado (ecuación [5.3]) para describir la actividad enzimática. Dicha adaptación consistió en eliminar la dependencia de la concentración de sustrato de la ecuación cinética, pues se había comprobado en el Apartado 3.3.2 que la concentración de glicerol no influía en la velocidad de producción en los experimentos realizados en matraz *Erlenmeyer*.

En el presente Capítulo (Apartado 6.1), se ha demostrado que esta conducta se debe a que los experimentos realizados en matraz están controlados por la transferencia de oxígeno. Sin embargo, los experimentos realizados en STBR a agitaciones a partir de

560 rpm presentan un comportamiento distinto, de tipo hiperbólico, tal y como muestra la Figura 6.11, que podría responder a una cinética de tipo Michaelis-Menten en la que la biomasa ejerce la actividad catalítica, siguiendo con la misma lógica de razonamiento que en el Apartado 5.1.2. Por lo tanto, en el presente Apartado se va a proponer un modelo cinético de este tipo para describir los experimentos B-560, B-650, B-750 y B-900.

De acuerdo con el modelo de Michaelis-Menten, la velocidad de producción de DHA se puede definir según la ecuación [6.16] (Nelson y col., 2008). Teniendo en cuenta la relación entre velocidad de reacción y velocidad de producción (ecuaciones [6.3] y [6.4]), la velocidad de consumo de glicerol se puede calcular a través de la expresión [6.17].

$$R_{DHA} = \frac{dC_{DHA}}{dt} = \frac{k_{cat} \cdot C_{Glic}}{k_m + C_{Glic}} \cdot C_X \quad [6.16]$$

$$R_{Glic} = -\frac{dC_{Glic}}{dt} = -v_G \cdot \frac{k_{cat} \cdot C_{Glic}}{k_m + C_{Glic}} \cdot C_X \quad [6.17]$$

Por ajuste del sistema de ecuaciones diferenciales anterior, se obtienen los parámetros cinéticos y estadísticos mostrados en la Tabla 6.6. Cabe destacar que se cumplen los criterios estadísticos de ajuste ya que el valor de F-Fisher obtenido (7003) es muy superior al tabulado para el 95 % de confianza (19,5), el porcentaje de variación explicada está muy cercano al 100 % y el valor de ERMC es muy bajo. Además, realizando un análisis de la distribución de los residuos calculados mediante la ecuación [6.15], se observa que la distribución es homogénea en torno al 0 y constante con el tiempo, de modo que casi todos los datos predichos por el modelo presentan un error relativo inferior al 10 %, tal y como se muestra en la Figura 6.12. Por lo tanto, el modelo obtenido representa fielmente los datos experimentales, como se puede observar en la Figura 6.13. Este hecho reafirma que en estos experimentos la etapa controlante de la velocidad del proceso es la reacción bioquímica, ya que pueden ser descritos con bastante precisión a través de un modelo que describe una cinética enzimática.

Tabla 6.6. Valores de los parámetros de ajuste y de los parámetros estadísticos obtenidos tras el ajuste en múltiple respuesta para los experimentos en biorreactor en los que controla la reacción bioquímica.

Parámetros de ajuste		Parámetros estadísticos	
Parámetro	Valor	Parámetro	Valor
k_{cat} (g _{DHA} /g _X ·h)	8,14 ± 0,67	VE (%)	99,1
k_m (g _{Glic} /L)	9,62 ± 1,96	F-Fischer	7003
ν_G (g _{Glic} /g _{DHA})	1,10 ± 0,01	ERMC	0,8

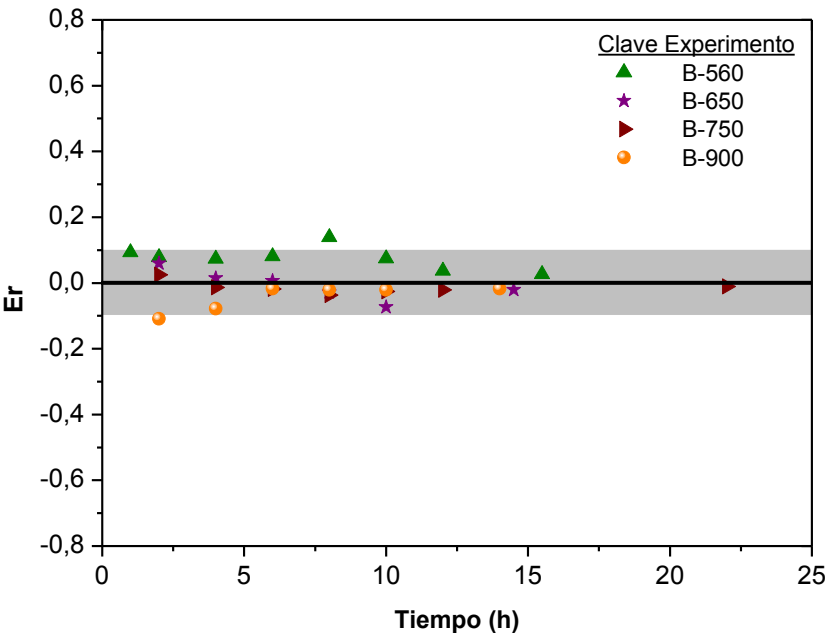


Figura 6.12. Análisis del error relativo obtenido en la predicción realizada con el modelo propuesto (ecuaciones [6.15] y [6.16]) para los experimentos realizados en biorreactor a $N > 560$ rpm.

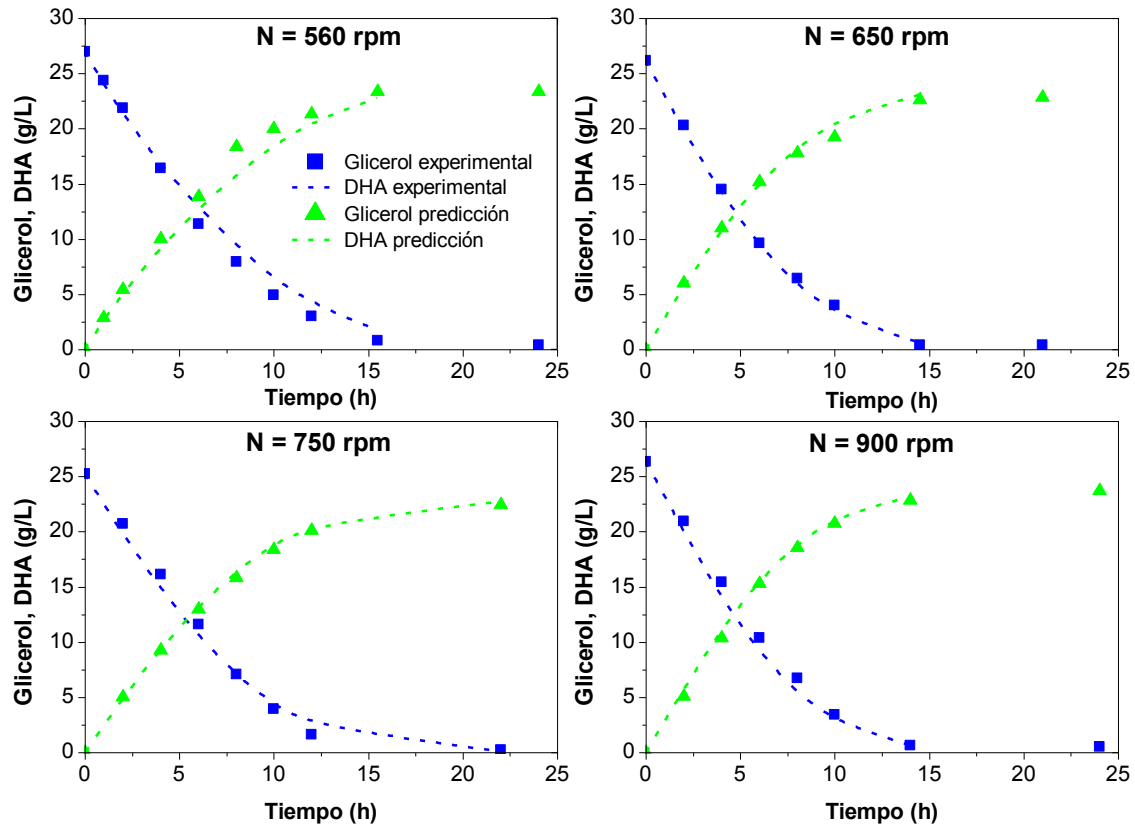


Figura 6.13. Comparación entre los valores experimentales y predichos por el modelo cinético propuesto para los experimentos con una concentración de biomasa de 0,5 g/L en estado de resting cells realizados en biorreactor tanque agitado a agitaciones superiores a 560 rpm.

6.2.2 Cinética controlada por la transferencia de oxígeno

En los experimentos B-300, B-360 y B-420 ($k_{La} < 0,0142 \text{ s}^{-1}$) la velocidad específica de consumo de oxígeno es inferior a la máxima y la actividad enzimática aumenta al aumentar k_{La} debido a que la etapa limitante es la velocidad de transferencia de oxígeno (ver Figura 5.23). Simulando dichos experimentos con el modelo de control de la reacción bioquímica planteado en el Apartado 6.2.1 (ecuaciones [6.16] y [6.17]) se observa que a medida que aumenta la agitación, el comportamiento se va acercando al descrito por el modelo de Michaelis-Menten, indicando que la influencia de la velocidad de transporte de oxígeno va siendo menor al aumentar la agitación, según se muestra en la Figura 6.14. No obstante, este modelo no es válido para describir el comportamiento cinético cuando la velocidad global del proceso está controlada por la velocidad de transporte de oxígeno.

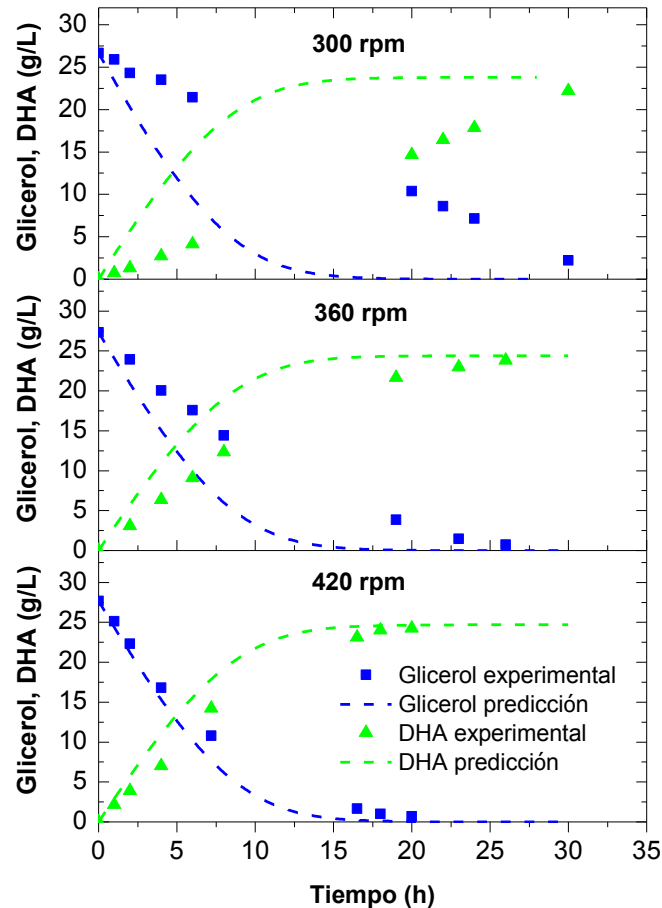


Figura 6.14. Simulación de los experimentos en biorreactor B-300, B-420 y B-560 con el modelo planteado para el caso en el que controla la reacción bioquímica, definido por las ecuaciones [6.16] y [6.17].

Por tanto, en estos experimentos realizados en STBR, cuya cinética está controlada por la velocidad de transferencia de oxígeno, tiene sentido formular un modelo análogo al que se desarrolló en el Apartado 6.1 para matraz *Erlenmeyer*. Ahora bien, en los experimentos en STBR no es necesario realizar la simplificación de que la concentración de oxígeno disuelto es despreciable a lo largo de todo el experimento, ya que esta variable se puede medir fácilmente en dicho dispositivo. En la Figura 6.11 (c) se puede apreciar que la concentración de oxígeno disuelto es mayor que cero y además, se puede observar su variación con el tiempo. Asimismo, la concentración de biomasa en el caldo sufre un ligero descenso con el tiempo, como ya se ha indicado, seguramente debido a los esfuerzos cortantes a los que son sometidas las bacterias en el interior del biorreactor, aunque este aspecto no parece afectar en exceso a la actividad enzimática. De este modo, el modelo cinético particularizado para estos experimentos en biorreactor queda representado por las siguientes ecuaciones:

$$R_{DHA} = \frac{Y_{DHA,O_2}^{máx.} \cdot C_X(t)}{k_X + C_X(t)} \cdot k_L a \cdot (C_{O_2}^* - C_{O_2}(t)) \quad [6.18]$$

$$R_{Glic} = -\nu_G \cdot \frac{Y_{DHA,O_2}^{máx.} \cdot C_X(t)}{k_X + C_X(t)} \cdot k_L a \cdot (C_{O_2}^* - C_{O_2}(t)) \quad [6.19]$$

En un ajuste preliminar del modelo propuesto en las ecuaciones [6.18] y [6.19] a los datos experimentales se obtuvo un valor de 0 para el parámetro k_X , indicando que este parámetro no tiene significación estadística y que, por tanto, se puede eliminar del modelo, quedando éste simplificado a las ecuaciones [6.20] y [6.21].

$$R_{DHA} = k'_{DHA,O_2} \cdot k_L a \cdot (C_{O_2}^* - C_{O_2}(t)) \quad [6.20]$$

$$R_{Glic} = -\nu_G \cdot k'_{DHA,O_2} \cdot k_L a \cdot (C_{O_2}^* - C_{O_2}(t)) \quad [6.21]$$

Realizando los ajustes correspondientes, se obtienen los parámetros cinéticos y estadísticos mostrados en la Tabla 6.7. Nuevamente, el valor de la F-Fisher obtenido es muy superior al tabulado para el 95 % de confianza (251), el porcentaje de variación explicada está próximo a la unidad y el valor de ERMC es bajo. Asimismo, la distribución del error relativo, calculado mediante la ecuación [6.15], es homogénea en torno al 0 y aproximadamente constante con el tiempo (Figura 6.15). La mayoría de los datos predichos presentan errores inferiores al 20 %, aunque se observa una desviación mayor en el experimento B-300. Esto es debido a que en dicho experimento (B-300) la relación C_{DHA} -t es lineal con el tiempo, ya que en las condiciones de este experimento la concentración de oxígeno disuelto en el caldo permanece en un valor muy cercano a 0 durante la biotransformación (cumple la suposición realizada para la formulación del modelo en matraz *Erlenmeyer*), mientras que en los experimentos B-360 y B-420 esta tendencia deja de ser lineal porque la concentración de oxígeno disuelto en el caldo es distinta de 0 (Figura 6.11 (c)) y el proceso está menos influido por la velocidad de transferencia de oxígeno. No obstante, las predicciones realizadas representan bastante bien ambos comportamientos cinéticos, tal y como se observa en la Figura 6.16. Por lo tanto, el modelo propuesto es capaz de describir correctamente el proceso productivo de DHA cuando se dan condiciones de limitación al transporte de oxígeno, sean más o menos acusadas.

Tabla 6.7. Valores de los parámetros de ajuste y de los parámetros estadísticos obtenidos tras el ajuste en múltiple respuesta para los experimentos en biorreactor en los que limita la transferencia de oxígeno.

Parámetros de ajuste		Parámetros estadísticos	
Parámetro	Valor	Parámetro	Valor
U_G (g _{Glic} /g _{DHA})	$1,12 \pm 0,04$	VE (%)	96,9
k'_{DHA,O_2} (mol DHA/mol O ₂)	$7,67 \pm 0,21$	F-Fischer	2279
-	-	ERMC	1,55

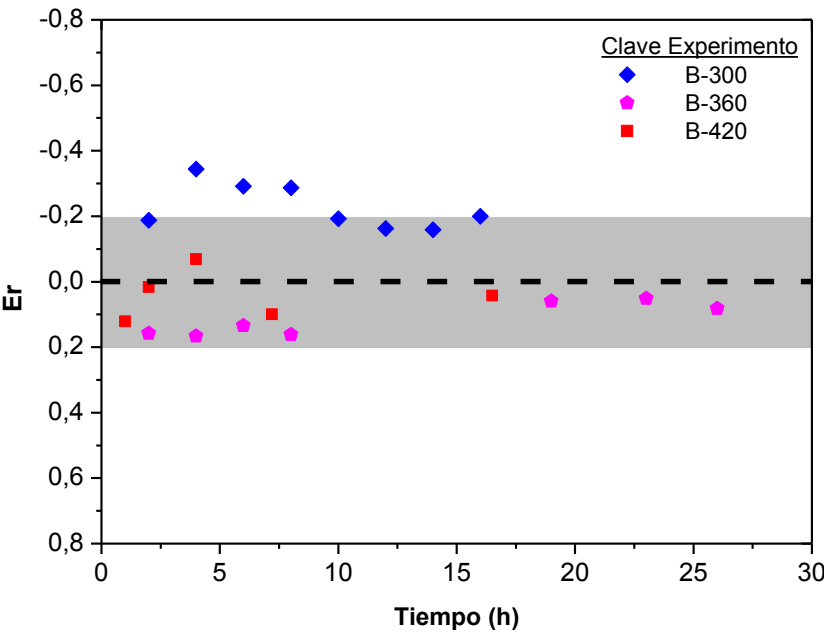


Figura 6.15. Análisis del error relativo obtenido en la predicción realizada con el modelo propuesto (ecuaciones [6.19] y [6.20]) para los experimentos realizados en biorreactor a $N < 560$ rpm.

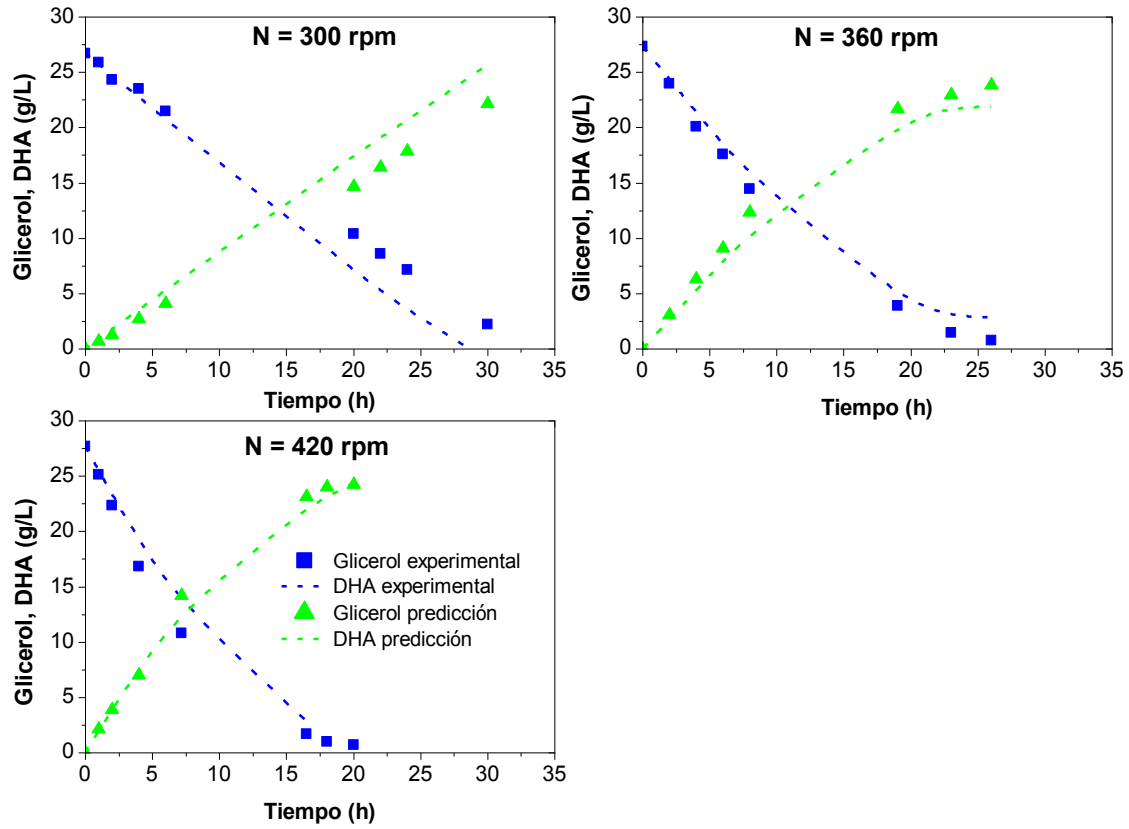


Figura 6.16. Comparación entre los valores experimentales y predichos por el modelo cinético propuesto para los experimentos con una concentración de biomasa de 0,5 g/L en estado de resting cells realizados en biorreactor tanque agitado a agitaciones inferiores a 560 rpm.

6.3 BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Alcón, A. 1999. Desarrollo de modelos cinéticos para bioprocesos: Aplicación a la producción de xantano. *Tesis Doctoral*, Departamento de Ingeniería Química, Universidad Complutense de Madrid.
- Almquist, J., Cvijovic, M., Hatzimanikatis, V., Nielsen, J., Jirstrand, M. 2014. Kinetic models in industrial biotechnology – improving cell factory performance. *Metabolic Engineering*, **24**, 38-60.
- Ben Yahia, B., Malphettes, L., Heinzle, E. 2015. Macroscopic modeling of mammalian cell growth and metabolism. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **99**(17), 7009-7024.
- Doran, P.M. 2013. Chapter 10 - mass transfer. in: *Bioprocess engineering principles (second edition)*, Academic Press. London, pp. 379-444.
- García-Ochoa, F., Romero, A., Santos, V.E. 1992. Comparison of methods for determining the kinetic parameters in complex reactions. *International Chemical Engineering*, **32**, 538-551.
- Nelson, D.L., Lehninger, A.L., Cox, M.M. 2008. *Lehninger principles of biochemistry. Chapter 6*. Macmillan.
- Nielsen, J., Villadsen, J. 1992. Modelling of microbial kinetics. *Chemical Engineering Science*, **47**(17), 4225-4270.
- Schultz, J.S. 1964. Cotton closure as an aeration barrier in shaken flask fermentations. *Applied microbiology*, **12**(4), 305-310.

CAPÍTULO 7.

PRODUCCIÓN DE DHA CON CÉLULAS EN ESTADO DE *RESTING CELLS* INMOVILIZADAS

CAPÍTULO 7.

PRODUCCIÓN DE DHA CON CÉLULAS EN ESTADO DE RESTING CELLS INMOVILIZADAS (ESTUDIO PRELIMINAR)

Índice

7.1	PREPARACIÓN DEL BIOCATALIZADOR.....	322
7.1.1	Estudio del tiempo de crecimiento	322
7.1.2	Estudio de las etapas de crecimiento	326
7.2	REUTILIZACIÓN DEL BIOCATALIZADOR	335
7.3	PRODUCCIÓN DE DHA EN <i>FED-BATCH</i> (STBR).....	339
7.4	ESTUDIO DE LA CONCENTRACIÓN DE LENTIKATS (STBR).....	349
7.5	BIBLIOGRAFÍA CITADA.....	360

CAPÍTULO 7.

PRODUCCIÓN DE DHA CON CÉLULAS EN ESTADO DE RESTING CELLS INMOVILIZADAS (ESTUDIO PRELIMINAR)

El empleo de células inmovilizadas en los bioprocesos es interesante desde el punto de vista operacional, ya que facilita la separación del biocatalizador del caldo de cultivo y permite la reutilización del mismo. Asimismo, en muchos casos, otra de las ventajas que supone el uso de células inmovilizadas es su potencial para aumentar la densidad celular en el biorreactor (Freeman y Lilly, 1998). Este aspecto es interesante en el sistema estudiado en este trabajo porque *G. oxydans* es una bacteria que presenta un bajo rendimiento biomasa-sustrato debido a la ineficiencia de su cadena transportadora de electrones, lo que se traduce en una escasa acumulación de biomasa en el caldo (Deppenmeier y col., 2002). Por otro lado, el soporte de las células puede evitar que se produzca estrés hidrodinámico causado por los esfuerzos cortantes a los que son sometidas las bacterias en el interior del biorreactor y protege a la célula del contacto directo con los compuestos tóxicos presentes en el medio circundante (Cassidy y col., 1996; Rocha-Martin y col., 2014). Precisamente, la potencial protección de la célula frente a la DHA y al estrés hidrodinámico es lo que ha motivado este estudio, ya que en el Capítulo 3 (apartado 3.4.2) se puso de manifiesto la fuerte inhibición por producto que presenta esta bacteria y en el Capítulo 5 (Figura 5.26) se observó una pérdida acusada de viabilidad celular con el tiempo cuando la agitación es alta en STBR.

La inmovilización de las células se puede llevar a cabo mediante aglomeración, atrapamiento o adsorción. Sin embargo, estas técnicas no están exentas de problemas técnicos. La aglomeración celular presenta un difícil manejo porque depende fuertemente de las condiciones de operación (temperatura, pH, agitación etc.), la adsorción es fundamentalmente un fenómeno electrostático que resulta fácil de conseguir, pero las células pueden desprenderse con facilidad por acción de la agitación. Por lo tanto, resulta más eficiente la inmovilización de las células mediante su atrapamiento en soportes porosos y, por ello, es el método más empleado (Freeman y Lilly, 1998). Estos soportes deben tener un tamaño de poro elevado para aumentar la superficie específica y permitir el intercambio de nutrientes con el medio, deben ser robustos, inertes, no tóxicos, duraderos, térmicamente estables (deben soportar 121°C) y

provocar poca pérdida de carga. Por ello, es fundamental escoger un material adecuado que cumpla los requisitos anteriores.

Existen distintos materiales utilizados para la inmovilización de células mediante atrapamiento. Entre ellos, destacan los siguientes: agarosa, colágeno, celulosa, carragenina, alginato, silicona, poliacrilamida, polivinilalcohol (PVA) y poliuretano. Sin embargo, la mayoría de ellos presenta alguna desventaja, tal como baja resistencia mecánica, elevada toxicidad para los microorganismos y/o alto coste económico. En la Tabla 7.1 se muestran los materiales empleados anteriormente en la inmovilización de *G. oxydans* y *A. xylinum* para la producción de DHA a partir de glicerol, así como otros datos de interés. De todos ellos, el que parece más apropiado es el PVA, por ser no tóxico y presentar un bajo coste económico en la fabricación a gran escala. Además, su elevada resistencia mecánica y elasticidad, hacen de este material un buen candidato para soportar los altos esfuerzos cortantes que se producen en un STBR (Wei y col., 2007).

Tabla 7.1. Soportes empleados en la inmovilización de *G. oxydans* para la producción de DHA a partir de glicerol.

Especie	Soporte	Dispositivo	Modo de operación (*CR/R)	Reutilización Ciclos/Pérdida actividad	**Pv (g _{DHA} /L·h)	Ref.
<i>G. oxydans</i>	Poliuretano	Matraz	Batch (CR)	5x96 h/ 40 %	0,28	(Dikshit y Moholkar, 2016a; Dikshit y Moholkar,
<i>G. xylinus</i>	Alginato de calcio	STBR	Batch (CR)	-	0,11	(Black, 2013)
<i>G. oxydans</i>	Alginato de sodio	Matraz	Batch (R)	-	0,34	(Lidia y Stanislaw, 2012)
<i>G. oxydans</i>	Silicona	Lecho fijo	Fed-Batch repetido (CR) Inmovilización <i>insitu</i>	26x16,5 h/-	3,7	(Hekmat y col., 2007)
<i>G. oxydans</i>	PVA	STBR	Batch (CR)	5x30 h/ 20 %	1,91	(Wei y col., 2007)
<i>G. oxydans</i>	PVA	STBR	Batch (CR)	-	-	(Raska y col., 2007)
<i>G. oxydans</i>	Alginato de calcio	Lecho fluidizado	Continuo (R)	5x24 h/ 50 %	-	(Adlercreutz y col., 1985)
<i>A. xylinum</i>	Poliacrilamida	Matraz	Batch (R)	3x40 h/ 50 %	1,13	(Nabe y col., 1979)

*CR = Células en crecimiento; R = Células en estado de resting cells. **Pv = Productividad volumétrica (ecuación [3.4]).

La tecnología LentiKats parece ser la más apropiada para llevar a cabo el atrapamiento del microorganismo en partículas de PVA, ya que el proceso de inmovilización transcurre a temperatura ambiente y en un entorno acuoso, evitando las pérdidas de actividad que se producen mediante otros métodos, como puede ser la gelación mediante múltiples etapas de congelación-descongelación (Krasňan y col., 2016). Además, la tecnología LentiKats permite obtener más de 200 partículas uniformes en un solo paso, gracias a la impresora LentiKats (Figura 2.8) desarrollada para la producción de células inmovilizadas a escala de laboratorio de una manera rápida y homogénea. No obstante, esta tecnología también se ha empleado con éxito a nivel de planta piloto según el esquema de proceso mostrado en la Figura 7.1 (a), que permite la producción de LentiKats en continuo (Schlieker y Vorlop, 2006).

Las partículas obtenidas mediante esta tecnología (LentiKats) presentan forma de lente (Figura 7.1 (b)), con un diámetro suficientemente grande para facilitar su separación por filtración (3-4 mm), un espesor de tan sólo 200-400 μm para favorecer la difusión interna y una porosidad elevada para aumentar la capacidad de inmovilización (Krasňan y col., 2016). A modo de ejemplo, la alta densidad celular en el biorreactor conseguida mediante esta tecnología ha permitido reducir en diez veces el tiempo requerido para el tratamiento de aguas residuales (Sievers y col., 2002; Sievers y col., 2003).

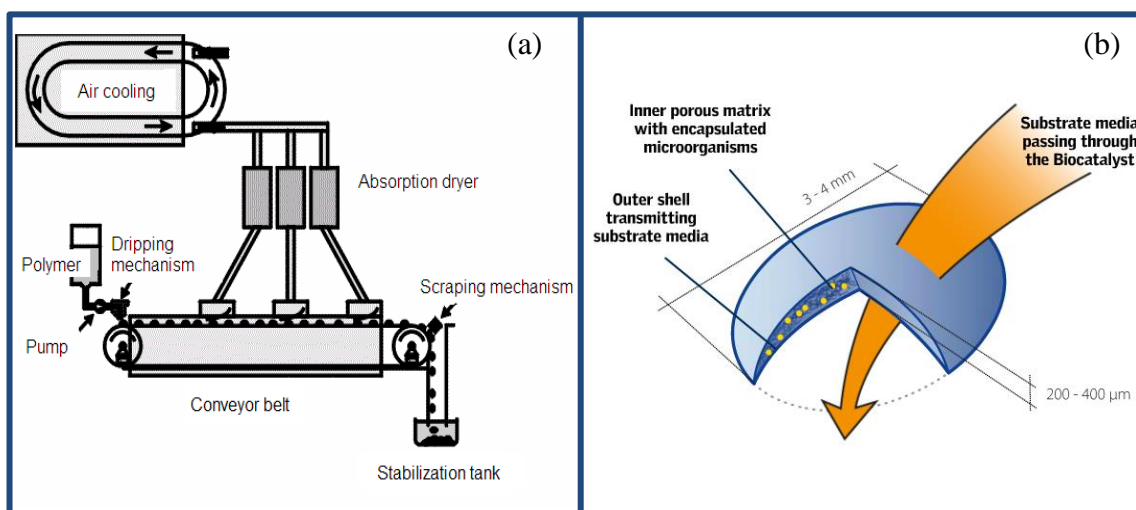


Figura 7.1. (a) Esquema del proceso a nivel de planta piloto desarrollado para la producción de LentiKats en continuo. (b) Vista esquemática de una partícula LentiKat. Imágenes obtenidas de la web: <http://www.lentikats.eu>.

Por las razones expuestas en los párrafos anteriores, se ha considerado interesante aplicar la tecnología LentiKats a la producción de DHA a partir de glicerol con *G. oxydans* con el objetivo de mejorar el proceso productivo incrementando la acumulación del producto a través del aumento de la densidad celular en el biorreactor y la resistencia a la DHA. También puede ser que se mejore la economía del proceso mediante la reutilización del biocatalizador en varios ciclos de producción. Para ello, se han realizado varios estudios preliminares enfocados a la preparación del biocatalizador (propagación del microorganismo en las LentiKats), se ha estudiado la posibilidad de reutilización, la operación en modo *fed-batch* para acumular altas concentraciones de producto en el caldo y el efecto de la concentración de LentiKats en el biorreactor para comprobar las ventajas de trabajar con una densidad celular elevada.

7.1 PREPARACIÓN DEL BIOCATALIZADOR

En el proceso de fabricación de LentiKats, éstas quedan inoculadas con un número de colonias determinado, recomendado por el equipo que desarrolló esta tecnología (Schlieker y Vorlop, 2006), según el procedimiento experimental descrito en el apartado 2.3.7. Sin embargo, es conveniente ampliar el tamaño de las colonias para aprovechar toda la superficie disponible de gel. No obstante, existe un nivel de población óptimo, puesto que, si el número de bacterias es excesivo, se pueden bloquear los poros de las LentiKats impidiendo que el sustrato llegue al interior, viéndose mermada la actividad del biocatalizador (Adlercreutz y col., 1985). Por este motivo, es fundamental establecer la metodología para la obtención de un biocatalizador activo. Las variables principales que afectan al crecimiento bacteriano son el tiempo de crecimiento en medio complejo y el número de etapas de crecimiento sucesivas.

7.1.1 Estudio del tiempo de crecimiento

En este apartado se va a realizar un estudio del tiempo de crecimiento de las colonias en las LentiKats para establecer a qué tiempo se alcanza la actividad enzimática máxima. Las LentiKats se han fabricado mezclando 20 mL de caldo con una concentración celular de 0,88 g/L y 80 mL de gel LentiKats, siguiendo los pasos descritos en el protocolo establecido en el apartado 2.3.7. De este modo, la carga de biomasa inicial es de 0,22 mg/mg gel, muy similar a otros estudios realizados con LentiKats (Rodríguez-Nogales y col., 2013). La cantidad total de LentiKats obtenidas empleando la relación anterior de caldo y gel fue de 35 g.

Para llevar a cabo el estudio, las LentiKats se han dejado crecer durante 5, 10, 15, 24 y 48 h en 100 mL de medio complejo 5YE3Pep (ver composición en Tabla 3.2) en matraz *Erlenmeyer* agitado en incubadora orbital a 300 rpm. La cantidad de LentiKats añadida a cada matraz ha sido de 26 g/L. El medio complejo se ha seleccionado en base a los buenos resultados en términos de crecimiento obtenidos en el apartado 3.2 (ver Figura 3.1 (e)), la concentración de LentiKats se ha fijado con la intención de trabajar con poca cantidad de biomasa (una concentración de biomasa inicial de 0,013 g/L, que podría multiplicarse por ocho, de acuerdo con los resultados obtenidos tras el crecimiento en el apartado 3.2) y el valor de la agitación se ha escogido, por un lado, para mantener todas las LentiKats en suspensión y, por otro, para asegurar que con la relación concentración de biomasa-agitación seleccionada, el sistema se encuentra en la zona de no limitación por transporte de oxígeno (ver Figura 4.12). Para evaluar la actividad del biocatalizador tras los diferentes tiempos de crecimiento se ha realizado un test de actividad enzimática, lavando previamente las LentiKats dos veces con tampón acetato para eliminar restos de fuente compleja. Dicho test de actividad enzimática se ha llevado a cabo dejando reaccionar las LentiKats con 25 g/L de glicerol en tampón acetato (20 mM), en las condiciones fluido-dinámicas anteriormente descritas. La planificación experimental se muestra en la Tabla 7.2.

Tabla 7.2. Planificación experimental para el estudio del tiempo de crecimiento de las colonias en las LentiKats.

Experimento	Tiempo de crecimiento (h)
Lent-t_{CR}0	0
Lent-t_{CR}5	5
Lent-t_{CR}10	10
Lent-t_{CR}15	15
Lent-t_{CR}24	24
Lent-t_{CR}48	48

➤ Resultados experimentales

Los resultados obtenidos del test de actividad enzimática realizado tras los diferentes tiempos de crecimiento en medio complejo se muestran en las Tablas 7.3 y 7.4.

Tabla 7.3. Resultados experimentales del test de actividad enzimática realizado tras 0, 5 y 10 h de crecimiento de las colonias en las LentiKats en medio complejo.

Tiempo (h)	$t_{CR} = 0h$		$t_{CR} = 5h$		$t_{CR} = 10h$	
	Glicerol (g/L)	DHA producida (g/L)	Glicerol (g/L)	DHA producida (g/L)	Glicerol (g/L)	DHA producida (g/L)
0	26,31	0,00	26,08	0,00	25,07	0,00
1	25,60	0,02	25,38	0,03	24,60	0,06
2	24,57	0,03	24,51	0,06	24,41	0,10
2,5	-	-	-	-	24,31	0,14
3	24,44	0,05	24,33	0,10	-	-
3,5	-	-	24,34	0,15	-	-
4	24,39	0,08	-	-	-	-

Tabla 7.4. Resultados experimentales del test de actividad enzimática realizado tras 15, 24 y 48 h de crecimiento de las colonias en las LentiKats en medio complejo.

Tiempo (h)	$t_{CR} = 15h$		$t_{CR} = 24h$		$t_{CR} = 48h$	
	Glicerol (g/L)	DHA producida (g/L)	Glicerol (g/L)	DHA producida (g/L)	Glicerol (g/L)	DHA producida (g/L)
0	25,16	0,00	24,28	0,00	28,53	0,00
1	25,09	0,08	23,97	0,17	28,16	0,11
2	25,08	0,17	23,67	0,33	27,91	0,27
3	25,03	0,24	23,43	0,52	27,68	0,45
4	24,86	0,33	23,12	0,70	27,40	0,66

➤ Discusión de los resultados

En la Figura 7.2 se ha representado la concentración de DHA producida en el test de actividad enzimática frente al tiempo con el objetivo de calcular la actividad enzimática a través de la pendiente por regresión lineal.

Tras realizar los ajustes correspondientes, se muestran en la Tabla 7.5 los valores de actividad enzimática obtenidos para cada experimento, así como el coeficiente de correlación, que en todos los casos es superior a 0,9, corroborando la bondad de los ajustes.

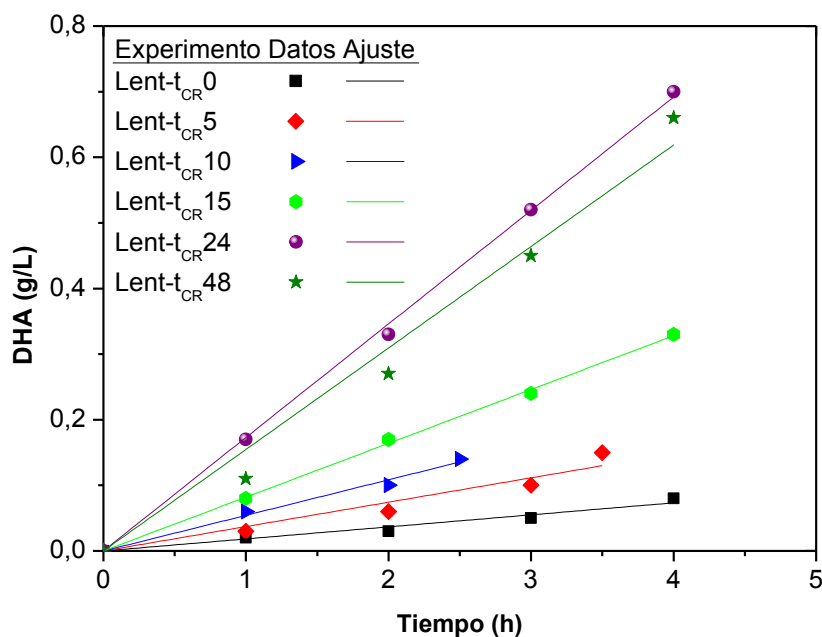


Figura 7.2. Representación de los ajustes lineales de los datos de concentración de DHA frente al tiempo para el cálculo de la actividad enzimática tras distintos tiempos de crecimiento de las colonias en las LentiKats.

Tabla 7.5. Valores de actividad enzimática (a_0) de los experimentos de crecimiento a distintos tiempos de las colonias en las LentiKats.

Experimento	a_0 (gDHA/L·h)	r^2
Lent-t _{CR} 0	0,018	0,986
Lent-t _{CR} 5	0,037	0,973
Lent-t _{CR} 10	0,054	0,995
Lent-t _{CR} 15	0,082	0,999
Lent-t _{CR} 24	0,173	0,999
Lent-t _{CR} 48	0,155	0,991

Finalmente, en la Figura 7.3 se puede observar la evolución de la actividad enzimática con el tiempo de crecimiento. Durante las primeras 24 h de crecimiento, la actividad enzimática aumenta de manera prácticamente lineal con el tiempo. Sin embargo, para tiempos mayores, no se observa ninguna mejora en la actividad enzimática. Esto puede ser debido a que el microorganismo ha alcanzado la fase estacionaria, es decir, se ha agotado la fuente compleja, o simplemente se ha alcanzado un nivel de población tal que los poros están siendo taponados por parte de la biomasa,

impidiendo de este modo que los nutrientes lleguen a las células alojadas en el interior de la partícula. En el siguiente apartado se tratará de esclarecer este punto. No obstante, se puede afirmar que en las condiciones experimentales escogidas, el tiempo de crecimiento que maximiza la actividad del biocatalizador es de 24 h.

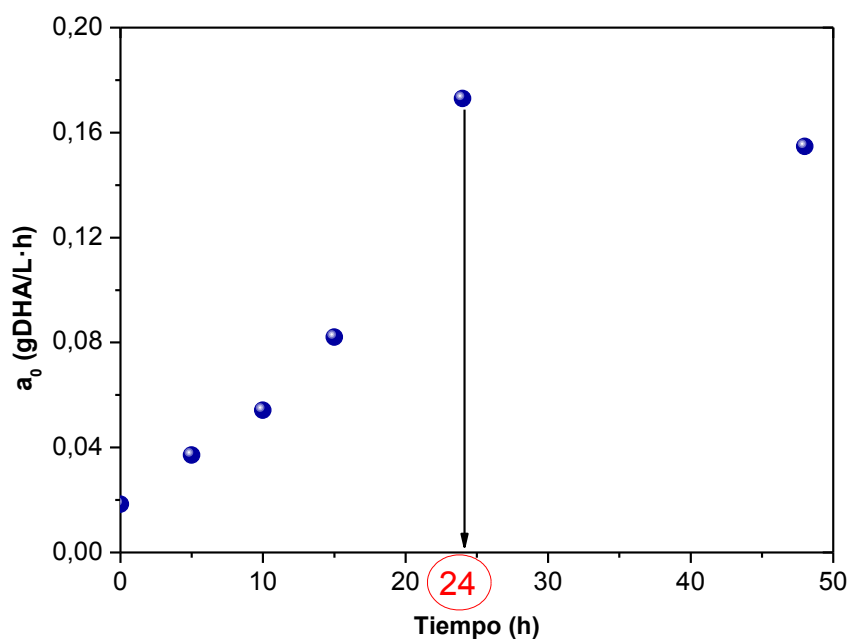


Figura 7.3. Efecto del tiempo de crecimiento de las colonias en las LentiKats en medio complejo sobre la actividad enzimática del biocatalizador.

7.1.2 Estudio de las etapas de crecimiento

En este apartado se va a realizar un estudio sobre el número de etapas sucesivas de crecimiento en medio fresco necesarias para poblar el biocatalizador de manera óptima. El empleo de un nuevo medio fresco tras la primera etapa de crecimiento permite dilucidar si en el apartado anterior la causa de que no aumente la actividad enzimática a partir de las primeras 24 h de crecimiento se debe a que se han agotado los nutrientes, o bien, se ha alcanzado el nivel de población máximo. Para ello, se han repetido varias etapas de crecimiento del biocatalizador en medio fresco de 24 h de duración, lavando las LentiKats entre etapas para eliminar restos del caldo anterior y evitar que se produzca acumulación de DHA que pueda afectar negativamente al crecimiento del microorganismo. Tras cada etapa de crecimiento se ha realizado un test de actividad

enzimática para evaluar la actividad del biocatalizador. Además, este estudio se ha llevado a cabo con tres concentraciones de LentiKats diferentes con el objetivo de observar si la actividad enzimática es proporcional a la concentración de LentiKats, porque lo contrario sería un indicativo de la existencia de limitaciones a la transferencia de materia, de oxígeno o problemas de difusión en poros, lo que podría invalidar los resultados del estudio (ver Figura 4.12). Las concentraciones de LentiKats escogidas para realizar el estudio son 26, 45 y 65 g/L, ya que concentraciones superiores requieren un grado de agitación más elevado para mantener las partículas en suspensión.

Se han realizado 5 etapas sucesivas de crecimiento midiendo la actividad enzimática tras cada etapa, según la metodología descrita en el apartado anterior. En la Tabla 7.6 se recoge la planificación experimental.

Tabla 7.6. Planificación experimental para el estudio de las etapas sucesivas de crecimiento de 24 h de las colonias en las LentiKats.

Experimento	LentiKats (g/L)	Nº etapas de crecimiento de 24 h
Lent26-CR ₀	26	0
Lent26-CR ₁	26	1
Lent26-CR ₂	26	2
Lent26-CR ₃	26	3
Lent26-CR ₄	26	4
Lent26-CR ₅	26	5
Lent45-CR ₀	45	0
Lent45-CR ₁	45	1
Lent45-CR ₂	45	2
Lent45-CR ₃	45	3
Lent45-CR ₄	45	4
Lent45-CR ₅	45	5
Lent65-CR ₀	65	0
Lent65-CR ₁	65	1
Lent65-CR ₂	65	2
Lent65-CR ₃	65	3
Lent65-CR ₄	65	4
Lent65-CR ₅	65	5

➤ Resultados experimentales

Los resultados experimentales obtenidos tras la realización de los correspondientes test de actividad enzimática después de cada una de las 5 etapas de crecimiento en medio fresco (CR₀-CR₅) se muestran en las Tablas 7.7 y 7.8 para una concentración de LentiKats de 26 g/L, en las Tablas 7.9 y 7.10 para una concentración de LentiKats de 45 g/L y en las Tablas 7.11 y 7.12 para una concentración de LentiKats de 65 g/L.

Tabla 7.7. Resultados experimentales del test de actividad enzimática realizado con 26 g/L de LentiKats sin etapa de crecimiento previa (Lent26-CR₀), tras 1 etapa de crecimiento (Lent26-CR₁) y tras 2 etapas de crecimiento (Lent26-CR₂).

Tiempo (h)	Lent26-CR ₀		Lent26-CR ₁		Lent26-CR ₂	
	Glicerol (g/L)	DHA (g/L)	Glicerol (g/L)	DHA (g/L)	Glicerol (g/L)	DHA (g/L)
0	29,09	0,00	28,53	0,00	28,61	0,00
1	-	-	28,36	0,11	28,48	0,14
2	-	-	28,21	0,27	28,17	0,35
3	29,02	0,05	27,88	0,45	27,86	0,52
4	28,99	0,06	27,70	0,66	27,18	0,77

Tabla 7.8. Resultados experimentales del test de actividad enzimática realizado con 26 g/L de LentiKats tras 3 etapas de crecimiento (Lent26-CR₃), tras 4 etapas de crecimiento (Lent26-CR₄) y tras 5 etapas de crecimiento (Lent26-CR₅).

Tiempo (h)	Lent26-CR ₃		Lent26-CR ₄		Lent26-CR ₅	
	Glicerol (g/L)	DHA (g/L)	Glicerol (g/L)	DHA (g/L)	Glicerol (g/L)	DHA (g/L)
0	29,30	0,00	32,12	0,00	27,27	0,00
1	28,72	0,12	31,87	0,17	26,99	0,16
2	28,11	0,34	31,71	0,39	26,84	0,35
3	27,80	0,54	31,00	0,61	26,60	0,59
4	27,05	0,73	29,96	0,89	26,52	0,84

Tabla 7.9. Resultados experimentales del test de actividad enzimática realizado con 45 g/L de LentiKats sin ninguna etapa de crecimiento previa (Lent45-CR₀), tras 1 etapa de crecimiento (Lent45-CR₁) y tras 2 etapas de crecimiento (Lent45-CR₂).

Tiempo (h)	Lent45-CR ₀		Lent45-CR ₁		Lent45-CR ₂	
	Glicerol (g/L)	DHA (g/L)	Glicerol (g/L)	DHA (g/L)	Glicerol (g/L)	DHA (g/L)
0	30,78	0,00	27,66	0,00	27,98	0,00
1	28,92	0,03	27,33	0,28	27,51	0,38
2	28,44	0,06	27,02	0,57	27,04	0,63
3	27,75	0,08	26,66	0,86	26,70	0,94
4	26,85	0,11	26,17	1,22	26,86	1,42

Tabla 7.10. Resultados experimentales del test de actividad enzimática realizado con 45 g/L de LentiKats tras 3 etapas de crecimiento (Lent45-CR₃), tras 4 etapas de crecimiento (Lent45-CR₄) y tras 5 etapas de crecimiento (Lent45-CR₅).

Tiempo (h)	Lent45-CR ₃		Lent45-CR ₄		Lent45-CR ₅	
	Glicerol (g/L)	DHA (g/L)	Glicerol (g/L)	DHA (g/L)	Glicerol (g/L)	DHA (g/L)
0	28,39	0,00	31,89	0,00	26,74	0,00
1	28,06	0,32	32,03	0,35	26,28	0,31
2	26,96	0,58	31,52	0,66	25,80	0,74
3	26,38	0,88	31,05	1,08	25,58	0,91
4	25,79	1,40	29,36	1,42	25,24	1,19

Tabla 7.11. Resultados experimentales del test de actividad enzimática realizado con 65 g/L de LentiKats sin ninguna etapa de crecimiento previa (Lent65-CR₀), tras 1 etapa de crecimiento (Lent65-CR₁) y tras 2 etapas de crecimiento (Lent65-CR₂).

Tiempo (h)	Lent65-CR ₀		Lent65-CR ₁		Lent65-CR ₂	
	Glicerol (g/L)	DHA (g/L)	Glicerol (g/L)	DHA (g/L)	Glicerol (g/L)	DHA (g/L)
0	30,65	0,00	28,00	0,00	27,79	0,00
1	-	-	27,73	0,33	26,71	0,89
2	30,34	0,08	27,09	0,72	26,96	1,37
3	30,29	0,11	26,57	1,27	26,62	1,52
4	29,60	0,20	25,20	1,67	25,59	2,10

Tabla 7.12. Resultados experimentales del test de actividad enzimática realizado con 65 g/L de LentiKats tras 3 etapas de crecimiento (Lent65-CR₃), tras 4 etapas de crecimiento (Lent65-CR₄) y tras 5 etapas de crecimiento (Lent65-CR₅).

Tiempo (h)	Lent65-CR ₃		Lent65-CR ₄		Lent65-CR ₅	
	Glicerol (g/L)	DHA (g/L)	Glicerol (g/L)	DHA (g/L)	Glicerol (g/L)	DHA (g/L)
0	29,25	0,00	31,63	0,00	26,47	0,00
1	28,38	0,52	29,74	0,47	25,78	0,37
2	26,83	1,10	29,47	0,88	25,46	0,78
3	26,23	1,43	29,09	1,45	24,79	1,31
4	25,68	1,95	28,20	1,95	24,19	1,79

➤ Discusión de los resultados

En la Figura 7.4 se muestran los ajustes lineales realizados para el cálculo de la actividad enzimática correspondiente a cada concentración de LentiKats ensayada tras las diferentes etapas de crecimiento (CR).

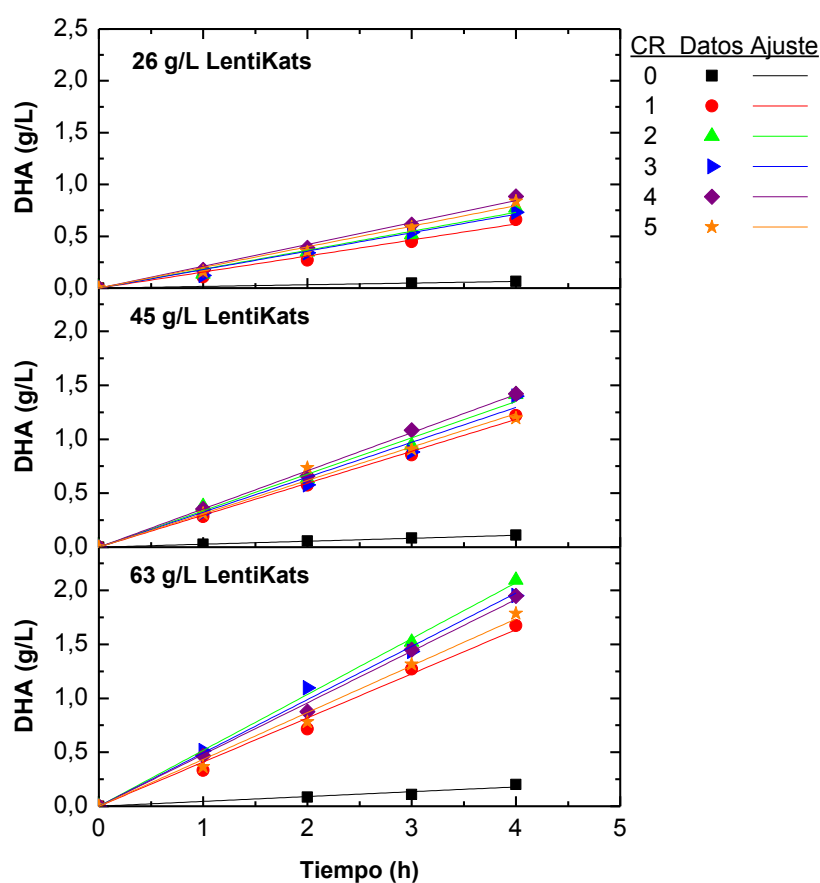


Figura 7.4. Ajustes lineales de los datos de concentración de DHA frente al tiempo para el cálculo de la actividad enzimática tras varias etapas de crecimiento de 24 h de las colonias en las LentiKats.

Los datos de actividad enzimática resultantes tras las regresiones lineales se recogen en la Tabla 7.13, junto con el coeficiente de correlación para indicar la bondad de los ajustes.

Tabla 7.13. Valores de actividad enzimática (a_0) tras sucesivas etapas de crecimiento de 24 h de las colonias en las LentiKats.

Experimento	a_0 ($\text{g}_{\text{DHA}}/\text{L}\cdot\text{h}$)	r^2
Lent26-CR ₀	0,02	0,999
Lent26-CR ₁	0,15	0,990
Lent26-CR ₂	0,18	0,993
Lent26-CR ₃	0,18	0,995
Lent26-CR ₄	0,21	0,996
Lent26-CR ₅	0,20	0,994
Lent45-CR ₀	0,03	0,999
Lent45-CR ₁	0,30	0,998
Lent45-CR ₂	0,34	0,992
Lent45-CR ₃	0,32	0,991
Lent45-CR ₄	0,35	0,999
Lent45-CR ₅	0,31	0,993
Lent65-CR ₀	0,04	0,978
Lent65-CR ₁	0,41	0,995
Lent65-CR ₂	0,52	0,999
Lent65-CR ₃	0,49	0,997
Lent65-CR ₄	0,48	0,998
Lent65-CR ₅	0,43	0,996

Representando la actividad enzimática en función del número de etapas de crecimiento para cada concentración de LentiKats se obtiene la Figura 7.5. En ella se observa que, tras una segunda etapa de crecimiento de 24 h, la actividad enzimática aumenta ligeramente con respecto a la primera etapa debido al incremento de la concentración de biomasa en el interior de las LentiKats. Por ello, se puede afirmar que la actividad enzimática no aumenta tras las primeras 24 h de crecimiento en la Figura 7.3 porque las células han entrado en la fase estacionaria por agotamiento de los nutrientes del medio. Sin embargo, tras realizar una tercera etapa de crecimiento, no se observa ningún aumento de actividad enzimática. Este comportamiento probablemente esté indicando que el biocatalizador presenta una carga de biomasa demasiado elevada que está taponando los poros e impidiendo que los nutrientes lleguen al interior de la partícula, de modo que la biomasa situada en dicha zona no puede realizar su función, disminuyendo la actividad del biocatalizador (Adlercreutz y col., 1985).

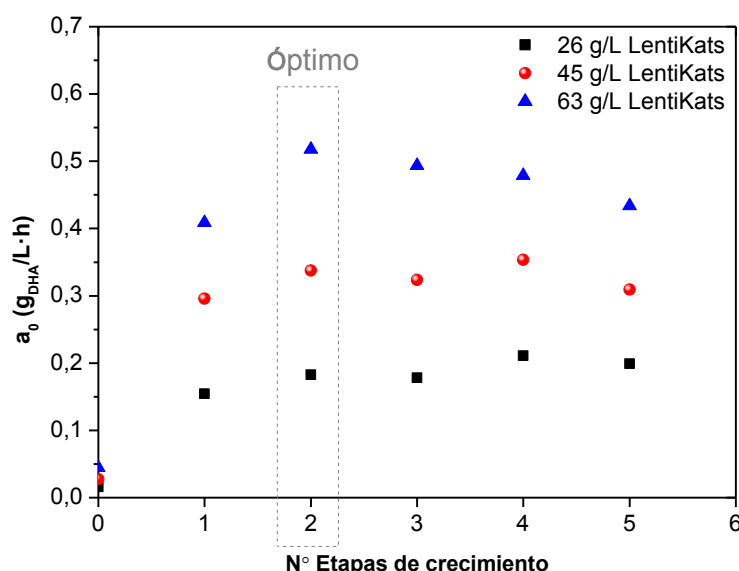


Figura 7.5. Efecto del número de etapas de crecimiento en medio fresco de las colonias en las LentiKats sobre la actividad del biocatalizador.

Para ilustrar de manera cualitativa la carga de biomasa que presenta el biocatalizador, se muestran en la Figura 7.6 imágenes obtenidas al microscopio de las LentiKats tras las distintas etapas de crecimiento, teñidas según la metodología expuesta en el apartado 2.3.7. En estas imágenes se observa que, tras fabricar las LentiKats (CR_0), las unidades formadoras de colonias son tan pequeñas que no se pueden apreciar con los aumentos de los que dispone el microscopio. Al llevar a cabo una primera etapa de crecimiento (CR_1), las colonias aumentan de tamaño y se pueden detectar al microscopio (color rosa), aunque todavía se observa mucha superficie del biocatalizador sin ocupar. Tras la segunda etapa de crecimiento (CR_2), en la imagen se muestra que la mayor parte de la superficie del biocatalizador está ocupada por bacterias. Por último, en etapas posteriores de crecimiento (CR_3 , CR_4 y CR_5) se aprecia con claridad una alta densidad celular en la partícula.

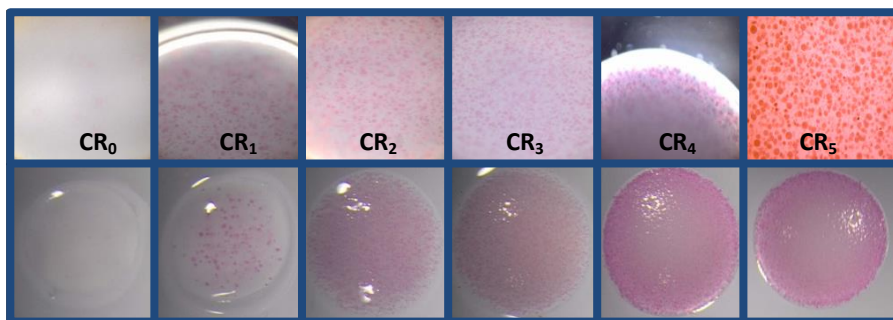


Figura 7.6. Imágenes de LentiKats obtenidas tras las distintas etapas de crecimiento de 24 h sobre medio fresco.

Cabría pensar, dados los antecedentes, que la elevada densidad celular obtenida tras el tercer crecimiento podría requerir una agitación mayor de la que se ha usado en el test de actividad enzimática para asegurar un suministro de oxígeno adecuado para todas las células y observar, de este modo, una actividad del biocatalizador mayor de la mostrada en la Figura 7.5.

Para confirmar que la agitación seleccionada en la incubadora orbital (300 rpm) no da lugar a un aporte insuficiente de oxígeno por célula cuando hay una mayor concentración de biomasa en el caldo, se ha representado la actividad enzimática en función de la concentración de LentiKats en la Figura 7.7. Como se puede apreciar, la actividad enzimática es proporcional a la concentración de LentiKats en todos los casos. Por analogía con el análisis realizado en matraz *Erlenmeyer* con células libres en el Apartado 4.3.2, se puede concluir que la agitación empleada es suficiente para aportar oxígeno suficiente a todas las células, ya que la relación entre actividad enzimática y concentración de LentiKats es lineal (ver Figura 4.12). Lógicamente, la pendiente varía en función de la densidad celular del biocatalizador. Tras el segundo crecimiento (densidad celular óptima), esta relación se puede expresar mediante la siguiente ecuación:

$$a_0 \left(\frac{g_{DHA}}{L \cdot h} \right) = 0,0079 \cdot C_{Lent} \left(\frac{g}{L} \right) \quad [7.1]$$

Otra manera de llegar a la misma conclusión es observando que la actividad enzimática específica (a_0^s), definida por la ecuación [7.2], es constante para las tres concentraciones de LentiKats estudiadas para un mismo nivel de densidad celular (Figura 7.8). En caso de que el aporte de oxígeno fuera un factor limitante, se observaría una disminución de la actividad enzimática específica, por analogía con la evolución de la productividad específica reflejada en la Figura 3.2 (Capítulo 3).

$$a_0^s = \frac{a_0}{C_{Lent}} \quad [7.2]$$

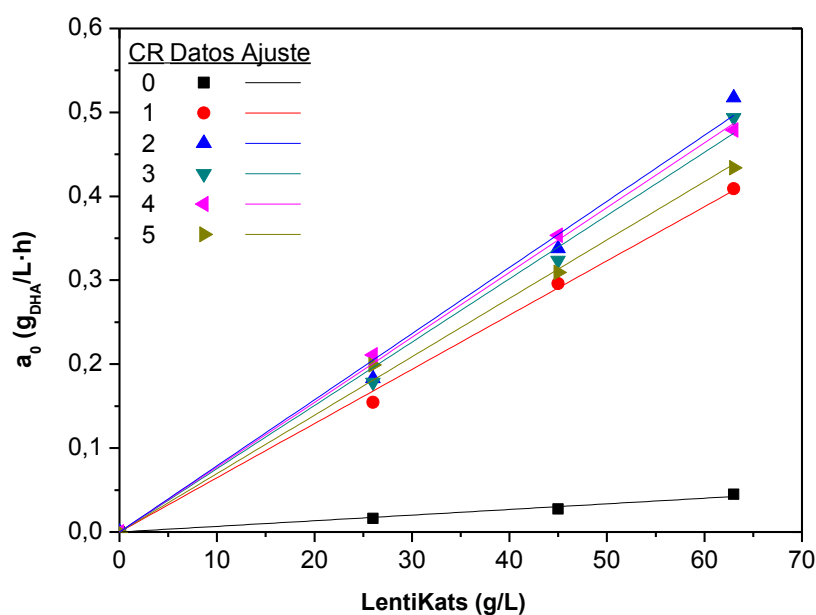


Figura 7.7. Relación entre actividad enzimática y concentración de LentiKats en el caldo para una agitación de 300 rpm.

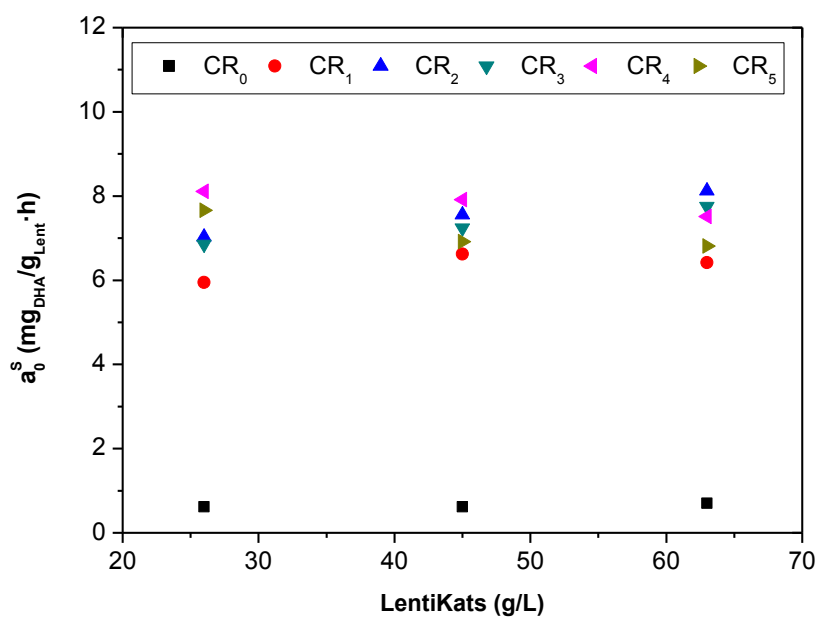


Figura 7.8. Relación entre la actividad enzimática específica y la concentración de LentiKats en el caldo para una agitación de 300 rpm.

Por lo tanto, queda demostrado que la agitación empleada no es la causa de que en la Figura 7.5 no se aprecie un aumento de actividad enzimática tras el tercer crecimiento, sino que la elevada densidad celular obtenida tras más de dos crecimientos probablemente está taponando los poros de la partícula influyendo negativamente en el transporte de los nutrientes hacia el interior de la misma. Por consiguiente, una densidad

celular óptima se consigue llevando a cabo dos etapas consecutivas de crecimiento de 24 h en medio complejo fresco (5YE3Pep) tras la fabricación de las LentiKats. Este protocolo de carga del biocatalizador es el que se va a aplicar para maximizar la actividad enzimática y proseguir con los estudios preliminares de producción de DHA con las células inmovilizadas en LentiKats.

7.2 REUTILIZACIÓN DEL BIOCATALIZADOR

La posibilidad de reutilización del microorganismo una vez inmovilizado es muy atractiva porque supone una disminución de los tiempos de proceso y un abaratamiento del coste económico, justificando la inversión adicional que implica el proceso de inmovilización. Por ello, en este apartado se ha realizado un estudio preliminar de producción de DHA en matraz *Erlenmeyer*, con una concentración de 64 g/L de LentiKats en estado de *resting cells*; es decir, empleando 25 g/L de glicerol en tampón acetato como único sustrato, sin adición de ningún otro nutriente para minimizar la producción de subproductos y facilitar doblemente el aislamiento y purificación posterior de la DHA. Se han realizado en total 6 ciclos de producción en discontinuo de 24 h de duración, filtrando y lavando con tampón acetato las LentiKats entre ciclos para evitar la acumulación de DHA y tomando muestras, al menos, durante las primeras 4 h para calcular la actividad enzimática y analizar el potencial de reutilización en función de la misma. En la Tabla 7.14 se muestra la planificación experimental, así como la nomenclatura de cada uno de los experimentos.

Tabla 7.14. *Planificación experimental para el estudio preliminar de reutilización de las LentiKats en ciclos sucesivos.*

Experimento	Nº Batch
Lent64-B ₁	1
Lent64-B ₂	2
Lent64-B ₃	3
Lent64-B ₄	4
Lent64-B ₅	5
Lent64-B ₆	6

➤ Resultados experimentales

Los resultados experimentales se muestran en las Tablas 7.15 y 7.16.

Tabla 7.15. Resultados experimentales del estudio preliminar de reutilización del biocatalizador inmovilizado en LentiKats (Batches 1, 2 y 3).

Tiempo (h)	Lent64-B ₁		Lent64-B ₂		Lent64-B ₃	
	Glicerol (g/L)	DHA producida (g/L)	Glicerol (g/L)	DHA producida (g/L)	Glicerol (g/L)	DHA producida (g/L)
0	26,47	0,00	27,36	0,00	26,63	0,00
1	25,89	0,32	26,39	0,49	25,82	0,59
2	25,43	0,81	25,74	1,02	25,51	0,92
3	25,02	1,24	24,94	-	25,07	1,36
4	24,62	1,78	24,65	2,07	24,60	2,02

Tabla 7.16. Resultados experimentales del estudio preliminar de reutilización del biocatalizador inmovilizado en LentiKats (Batches 4, 5 y 6).

Tiempo (h)	Lent64-B ₄		Lent64-B ₅		Lent64-B ₆	
	Glicerol (g/L)	DHA producida (g/L)	Glicerol (g/L)	DHA producida (g/L)	Glicerol (g/L)	DHA producida (g/L)
0	27,53	0,00	27,18	0,00	27,56	0,00
1	26,58	0,46	26,18	0,53	26,98	0,46
2	25,88	0,92	26,06	0,88	26,43	0,99
3	25,37	1,44	25,14	1,34	25,88	1,37
4	-	-	25,53	1,89	25,31	1,86
5	23,86	2,51	-	-	-	-
22,5	15,33	11,42	-	-	-	-
24	-	-	15,88	11,07	24,00	14,47
48	-	-	-	-	48,00	8,08

➤ Discusión de los resultados

La actividad enzimática de cada uno de los ciclos de producción se ha calculado como la pendiente de las rectas de concentración de DHA frente al tiempo por regresión lineal. Los ajustes se muestran en la Figura 7.9 y los resultados se recogen en la Tabla 7.17. Asimismo, la evolución de la actividad enzimática tras los diferentes ciclos productivos se muestra en la Figura 7.10.

En la Figura 7.10 se puede observar que la actividad enzimática permanece prácticamente constante después de 6 ciclos productivos de 24 h. Por lo que, se confirma el potencial de reutilización que presentan las LentiKats. Con el fin de comparar los resultados obtenidos con los datos bibliográficos recogidos en la Tabla

7.1, se ha calculado la actividad remanente en el 6º ciclo como el porcentaje relativo con respecto al valor más alto obtenido según la Tabla 7.17 (2º ciclo) y se ha representado en función del número de horas totales de uso del biocatalizador junto con los datos bibliográficos en la Figura 7.11.

Cabe resaltar que los datos preliminares obtenidos en este estudio son prometedores porque se mantiene un 90 % de la actividad inicial después de 144 h de uso del biocatalizador, siendo este dato el más alto de los hallados en bibliografía para un tiempo de uso del biocatalizador similar. No obstante, sería recomendable ampliar el estudio con un número mayor de ciclos productivos para cuantificar el número máximo de veces que se pueden reutilizar las LentiKats sin una pérdida de actividad relevante y poder comparar este dato con el proporcionado por Dikshit y Moholkar (2016a) para 480 horas de uso.

Por otro lado, estos experimentos se han realizado sin permitir la acumulación de elevadas concentraciones de DHA en el medio ya que, tras cada ciclo, se ha utilizado medio fresco y se han lavado las LentiKats. Por ello, no se ha podido determinar el nivel de protección que ofrece este soporte frente a la toxicidad derivada de la acumulación de producto en el caldo en un sistema en el que la inhibición por producto es uno de los puntos débiles. Este estudio se va a llevar a cabo en el siguiente apartado.

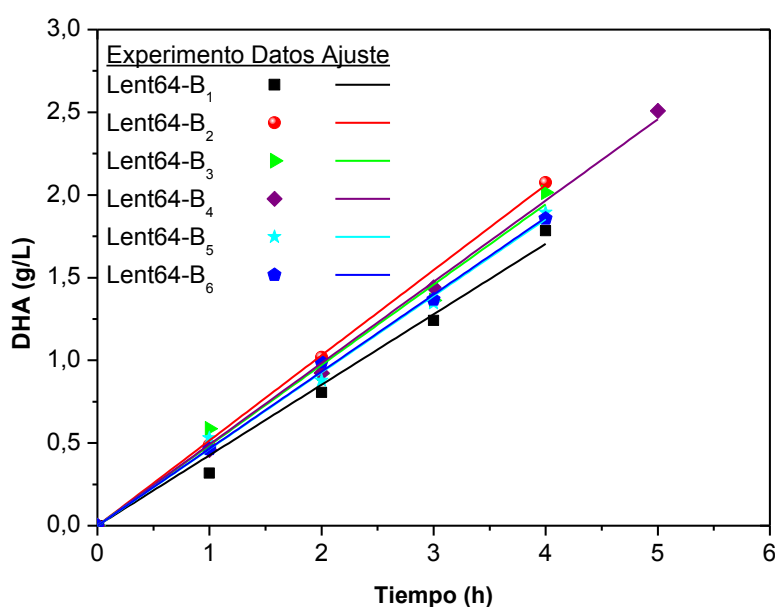


Figura 7.9. Representación de los ajustes lineales de los datos de concentración de DHA frente al tiempo para el cálculo de la actividad enzimática de cada uno de los ciclos de producción realizados con las mismas LentiKats.

Tabla 7.17. Valores de actividad enzimática (a_0) de cada uno de los ciclos de reutilización de las LentiKats.

Experimento	a_0 (g _{DHA} /L·h)	r^2
Lent64-B ₁	0,43	0,995
Lent64-B ₂	0,52	0,999
Lent64-B ₃	0,49	0,995
Lent64-B ₄	0,49	0,998
Lent64-B ₅	0,46	0,997
Lent64-B ₆	0,47	0,999

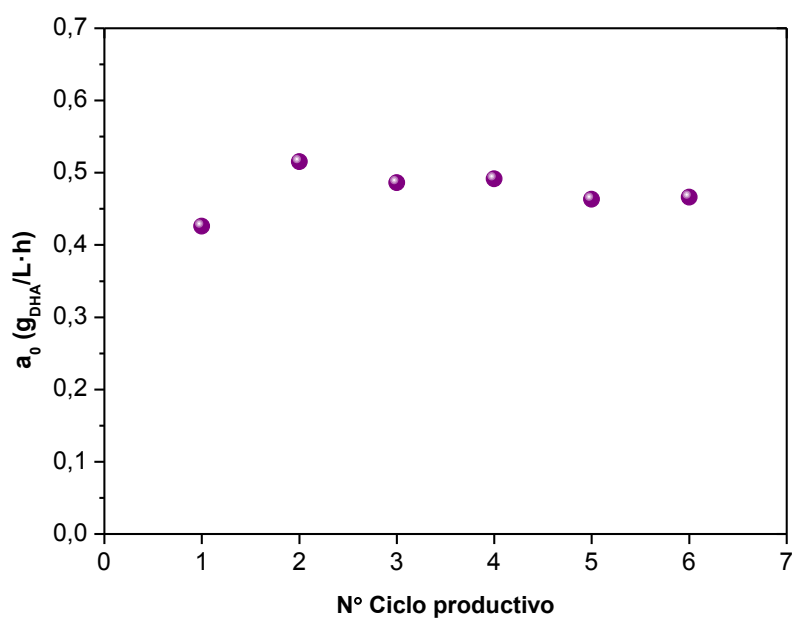


Figura 7.10. Evolución de la actividad enzimática tras los distintos ciclos productivos de 24 h realizados con las mismas LentiKats.

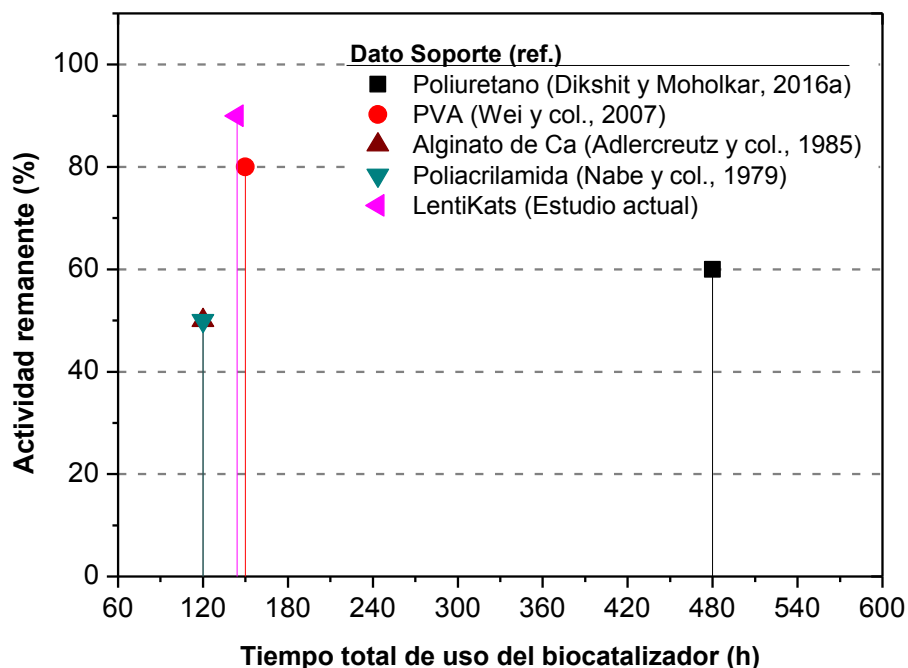


Figura 7.11. Comparación de los datos experimentales con los datos bibliográficos de la actividad remanente tras la reutilización del biocatalizador en función del tiempo total de uso.

7.3 PRODUCCIÓN DE DHA EN *FED-BATCH* (STBR)

Además de la reutilización, otra de las ventajas del empleo de células inmovilizadas ampliamente descrita en bibliografía es la protección que proporciona el soporte frente a los compuestos tóxicos acumulados en el medio, atenuando de este modo la inhibición por producto (Cassidy y col., 1996; Pessela y col., 2003; Gungormusler-Yilmaz y col., 2016).

Por otra parte, la mayoría de los estudios consultados relativos a la producción de DHA con *G. oxydans* operan en modo *fed-batch* para conseguir una alta concentración de producto en el caldo y disminuir el efecto de la inhibición por sustrato (Bories y col., 1991; Claret y col., 1992; Bauer y col., 2005; Hu y col., 2010; Zheng y col., 2016; Zhou y col., 2016). A pesar de que en el apartado 3.3.2 se concluyó que no existe fenómeno de inhibición por sustrato para concentraciones de glicerol de hasta 134 g/L, adicionalmente se observó que el aumento de la concentración inicial de glicerol comporta una mayor producción de ácido glicérico. Por lo tanto, según los datos presentados en esta Tesis Doctoral, es recomendable operar en modo *fed-batch* para minimizar la producción de subproducto y mejorar el rendimiento de la DHA.

En este apartado se va a evaluar la potencial protección frente a la inhibición por producto que presentan las LentiKats frente a las células libres, haciendo sendos experimentos en modo *fed-batch*, ya que además de constituir la forma de operar más recomendable, permite la acumulación de producto y, por tanto, la evaluación de la ventaja competitiva de la inmovilización del biocatalizador frente a la operación con células libres, teóricamente más vulnerables a la presencia de DHA. Los experimentos se han realizado con una concentración de LentiKats de 65 g/L (previamente tratadas como se describe en el apartado 7.1.2 para alcanzar una densidad celular óptima) y una concentración de células libres de 0,5 g/L, respectivamente. Ambos experimentos se han llevado a cabo en STBR con una aireación de 1 vvm, una agitación de 560 rpm (determinada en el Capítulo 5 para evitar que el fenómeno limitante sea la transferencia de oxígeno), a pH controlado en torno a 5 y una concentración de glicerol en tampón acetato de entre 25 y 10 g/L. En la Tabla 7.18 se muestra la planificación experimental.

Tabla 7.18. Planificación experimental para el estudio de la tolerancia frente la DHA de las células libres e inmovilizadas en LentiKats.

Experimento	Concentración de biocatalizador (g/L)	Modo de operación	Células
Lent64-FB	64	<i>Fed-batch</i>	Inmovilizadas
Libres0,5-FB	0,5	<i>Fed-batch</i>	Libres

➤ Resultados experimentales

Los resultados experimentales se recogen en las Tablas 7.19 a 7.21.

Tabla 7.19. Resultados experimentales de producción de DHA en modo fed-batch con células inmovilizadas en LentiKats y en estado de reposo (Lent64-FB).

Tiempo (h)	pH	Glicerol (g/L)	DHA (g/L)	Ácido glicérico (g/L)
0	5,19	33,29	0,00	0,00
2	5,18	31,39	1,35	0,01
4	5,16	27,06	2,64	0,02
6	5,12	26,76	4,21	0,04
7	5,11	23,47	4,39	0,04
19	5,06	13,21	12,77	0,12
22	5,05	11,49	14,98	0,14
23	5,05	10,91	15,70	0,15
23	5,05	25,35	14,93	0,14
25	5,05	23,99	16,37	0,16
27	5,05	22,95	17,69	0,20
29	5,05	21,83	19,01	0,21
44	5,05	14,45	28,21	0,40
46	5,05	13,05	29,77	0,52
48	5,05	12,82	30,24	0,53
48	5,05	28,07	29,13	0,40
50	5,05	27,00	30,09	0,56
52	5,05	26,14	31,26	0,60
68	5,05	20,01	39,12	0,66
70	5,05	19,55	39,30	0,71
72	5,05	19,19	39,86	0,73
74	5,05	17,67	41,61	0,73
76,5	5,05	18,00	41,75	0,78
92,3	5,05	14,40	46,54	1,13
95,2	5,05	12,96	48,51	1,26
166,1	5,05	7,55	56,59	1,79
198	5,05	5,13	57,99	2,05

Tabla 7.20. Resultados experimentales del estudio de producción de DHA en modo fed-batch con células libres en estado de reposo (Libres0,5-FB).

Tiempo (h)	Biomasa (g/L)	pH	Glicerol (g/L)	DHA (g/L)	Ácido glicérico (g/L)
0	0,53	5,44	24,29	0,00	0,00
2	0,43	5,36	19,82	4,88	0,00
4	0,45	5,28	15,85	9,93	0,04
6	0,41	5,21	12,34	14,03	0,07
7	0,39	5,18	10,55	16,32	0,09
8	0,42	5,16	9,01	18,15	0,10
8		5,11	25,30	17,43	0,10
10	0,41	5,10	22,08	20,97	0,14
15,2		5,10	14,27	30,61	0,25
16,2	0,40	5,05	14,08	30,78	0,27
16,2		5,05	26,84	30,30	0,26
23,8		5,05	18,89	40,20	0,43
26		5,05	19,61	39,18	0,46
28	0,38	5,05	15,18	44,95	0,50
30		5,05	13,54	46,72	0,54
32		5,05	12,24	48,59	0,56
53,7	0,34	5,05	3,64	60,86	0,81
58		5,05	3,04	61,43	0,84

Tabla 7.21. Evolución de la concentración de oxígeno disuelto para los estudios de producción de DHA en modo fed-batch con células en estado de reposo tanto libres, como inmovilizadas.

Lent64-FB				Libres0,5-FB			
Tiempo (min)	C _{O2} (%)	Tiempo (min)	C _{O2} (%)	Tiempo (min)	C _{O2} (%)	Tiempo (min)	C _{O2} (%)
0,0	100,0	2577,6	69,0	0,0	100,0	840,0	49,4
0,8	94,6	2817,6	71,5	1,2	97,4	960,0	53,7
1,0	93,7	2907,6	72,1	1,5	89,8	1080,0	56,4
1,5	93,0	3357,6	74,5	1,8	81,2	1200,0	58,4
1,8	92,0	3597,6	75,6	2,0	73,9	1320,0	60,9
2,0	91,1	3717,6	76,4	2,3	68,1	1440,0	62,4
2,3	90,3	3837,6	77,1	3,0	58,3	1560,0	65,4
3,5	85,2	3957,6	79,2	3,5	49,5	1680,0	67,8
4,3	83,6	4077,6	79,1	5,0	42,0	1800,0	69,4
5,3	81,9	4317,6	80,4	8,0	33,9	1920,0	72,5
8,5	80,1	4527,6	80,7	9,5	29,0	2040,0	74,2
12,6	79,6	4677,6	81,8	12,0	23,1	2160,0	76,5
61,4	78,5	4827,6	82,8	20,3	20,8	2280,0	78,6
132,0	75,9	5547,6	84,4	21,5	16,3	2400,0	80,7
204,0	74,2	5787,6	84,6	25,8	14,2	2520,0	82,5
417,6	72,6	5997,6	85,1	26,0	13,4	2640,0	84,4
627,6	72,4	6597,6	84,8	30,0	13,1	2880,0	87,7
927,6	71,5	6807,6	85,1	60,0	13,8	3000,0	89,2
1137,6	70,8	7257,6	86,3	72,3	16,7	3120,0	90,5
1347,6	70,2	7647,6	87,1	86,5	17,6	3240,0	91,7
1527,6	69,4	7947,6	87,6	86,7	18,1	3360,0	92,7
1767,6	68,7	8157,6	88,7	89,5	18,5	3480,0	93,7
2067,6	68,8	8367,6	90,1	90,0	19,4	3600,0	94,5
2577,6	69,0	8907,6	90,3	120,0	24,9		
2817,6	71,5	9177,6	90,8	240,0	27,5		
1137,6	70,8	9387,6	91,8	360,0	36,7		
1347,6	70,2	10467,6	92,2	480,0	37,5		
1527,6	69,4	10977,6	95,0	600,0	42,1		
1767,6	68,7	11442,9	96,0	720,0	44,6		

➤ Discusión de los resultados

En la Figura 7.12 se muestra la evolución con el tiempo de los distintos compuestos involucrados en la biotransformación. A grandes rasgos, se observa que el proceso con células inmovilizadas en LentiKats transcurre de manera mucho más lenta. El tiempo invertido en la conversión del glicerol alimentado es unas 3,5 veces superior al requerido por las células libres (Figura 7.12 (a)). No obstante, la concentración final de DHA obtenida con células libres e inmovilizadas es idéntica (alrededor de 60 g/L).

Por otro lado, la acumulación de subproducto es superior en el proceso con células inmovilizadas (Figura 7.12 (c)). Este comportamiento es debido al aumento del tiempo de reacción, como se demostró en el apartado 5.2.2.

Asimismo, cabe destacar que el oxígeno disuelto no cae en ninguno de los dos casos por debajo del 10 % con respecto a la concentración de saturación ($C_{O_2}^{Crít}$), por lo que no debe existir limitación al transporte de oxígeno, al menos, en lo que a difusión externa se refiere.

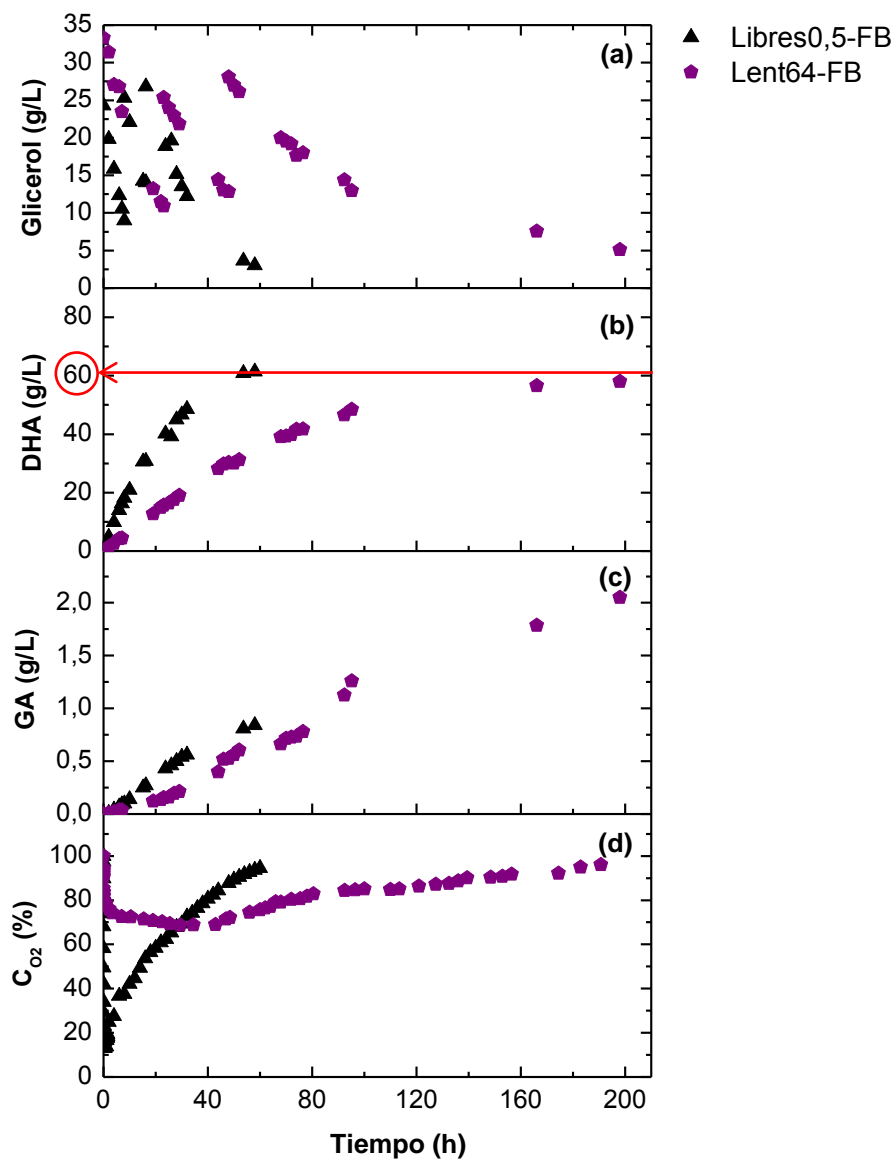


Figura 7.12. Evolución con el tiempo del glicerol (a); la DHA (b); el ácido glicérico (c) y el oxígeno disuelto (d) para los experimentos realizados en modo fed-batch con células libres e inmovilizadas.

Para realizar un estudio cuantitativo del efecto de la acumulación de DHA en el medio, se ha calculado la velocidad de consumo de glicerol tras cada pulso introducido, a través de la pendiente de las rectas (ver ajustes en Figura 7.13). Adicionalmente, se ha calculado la actividad remanente como el cociente entre la velocidad de consumo tras el pulso “n” con respecto a la velocidad de consumo tras el primer pulso (sin DHA inicial), según la ecuación [7.3]. Los resultados se recogen en la Tabla 7.22.

$$\text{Actividad remanente (\%)} = \frac{R_{\text{Glic}}^n}{R_{\text{Glic}}^1} \cdot 100 \quad [7.3]$$

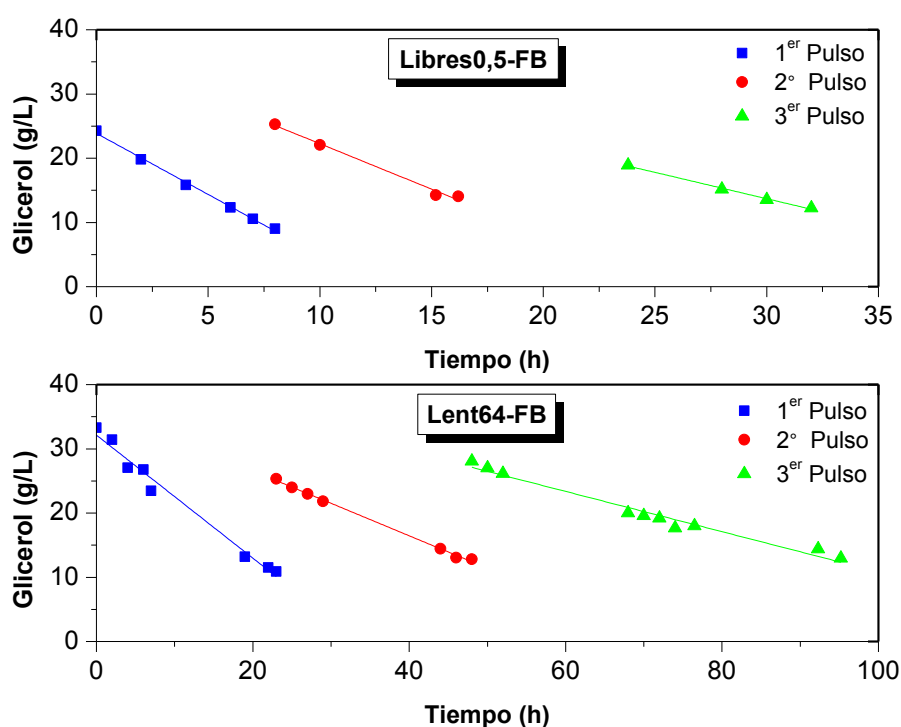


Figura 7.13. Representación de los ajustes lineales de los datos de concentración de glicerol frente al tiempo para el cálculo de la velocidad de consumo en los experimentos en modo fed-batch con células libres e inmovilizadas.

Tabla 7.22. Comparativa de la velocidad de consumo (R_{Glic}) y la actividad remanente tras cada pulso de glicerol para los experimentos Libres0,5-FB y Lent64-FB.

Pulso	Libres0,5-FB			Lent64-FB		
	R_{Glic} (g/L·h)	r^2	Actividad remanente (%)	R_{Glic} (g/L·h)	r^2	Actividad remanente (%)
1 ^{er} pulso	1,90	0,996	100	0,96	0,981	100
2 ^o pulso	1,42	0,987	75	0,52	0,997	54
3 ^{er} pulso	0,82	0,994	43	0,31	0,972	33

Los resultados de esta tabla muestran que la velocidad de consumo de glicerol es menor en el caso del experimento realizado con células inmovilizadas, probablemente debido a que la concentración de biomasa es inferior. No obstante, en ambos casos, se produce una disminución acusada de la velocidad de consumo de glicerol tras cada pulso, seguramente como consecuencia de la acumulación de DHA. En la Figura 7.14 se sustenta esta afirmación. La disminución de la velocidad de consumo de glicerol presenta una tendencia lineal con la concentración de DHA inicial, entendiendo esta última como la concentración de DHA al comienzo del nuevo pulso de glicerol introducido. Este comportamiento se corresponde con el fenómeno de inhibición por producto descrito en el apartado 3.4.2 (ver Figura 3.17). Las ecuaciones [7.4] y [7.5] reflejan este decrecimiento en la velocidad de consumo de glicerol para los experimentos con células libres e inmovilizadas, respectivamente.

$$R_{Glic} = -0,032 \cdot C_{DHA}^0 + 1,90 \quad r^2 = 0,996 \quad [7.4]$$

$$R_{Glic} = -0,023 \cdot C_{DHA}^0 + 0,96 \quad r^2 = 0,988 \quad [7.5]$$

Según las expresiones anteriores, la velocidad de consumo de glicerol se anularía cuando la concentración inicial de DHA antes del pulso fuera de 42 g/L para el caso de las células inmovilizadas, y de 59 g/L en el experimento con células libres en las condiciones experimentales ensayadas.

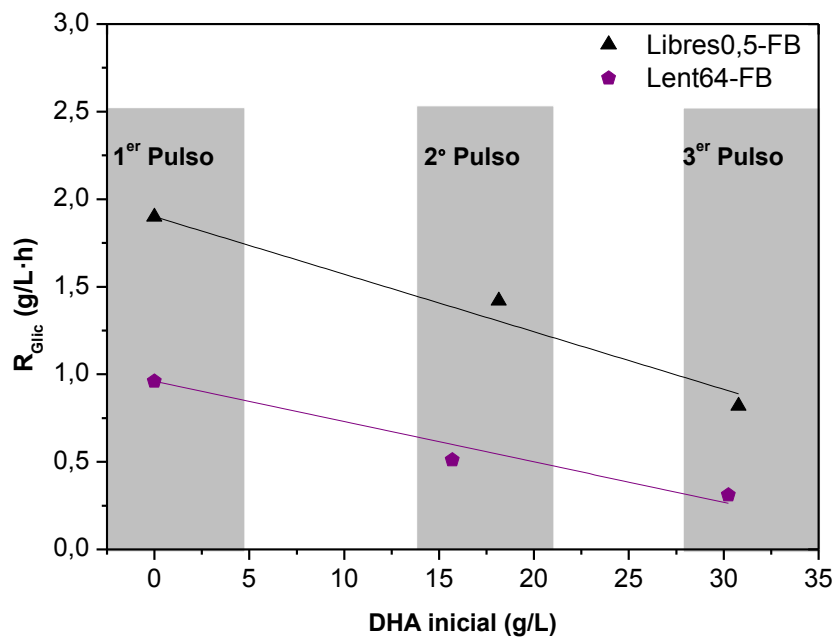


Figura 7.14. Evolución de la velocidad de consumo de glicerol en función de la concentración de DHA previa tras cada pulso para los experimentos con células libres e inmovilizadas.

El resultado anterior es sorprendente porque indica que el experimento realizado con células inmovilizadas tolera menor concentración de DHA que el experimento realizado con células libres, teóricamente más vulnerables. De hecho, normalizando los resultados de disminución de velocidad de consumo mediante el cálculo de la actividad remanente, se observa que en el caso del experimento realizado con LentiKats se pierde más actividad tras el 2^o y 3^{er} pulso que en el experimento con células libres (ver Figura 7.15).

La principal diferencia entre ambos experimentos es que en el experimento con células inmovilizadas (Lent64-FB) el proceso transcurre mucho más lento, aumentando con ello el tiempo de exposición de las células a la DHA y, como consecuencia, el daño celular asociado (Izuo y col., 1980; Ohrem y Voss, 1996; Hekmat y col., 2003). Por tanto, para poder comprobar si la inmovilización protege realmente a las células de la inhibición por producto y poder determinar la concentración máxima de DHA que puede alcanzarse con células inmovilizadas, ambos experimentos deberían haberse llevado a cabo a la misma velocidad, para que el tiempo de exposición no sea otra variable más. Es decir, con una concentración de biomasa equivalente, ya que una menor concentración de biomasa parece la causa más probable de que el proceso con LentiKats vaya más lento que con 0,5 g/L de células libres.

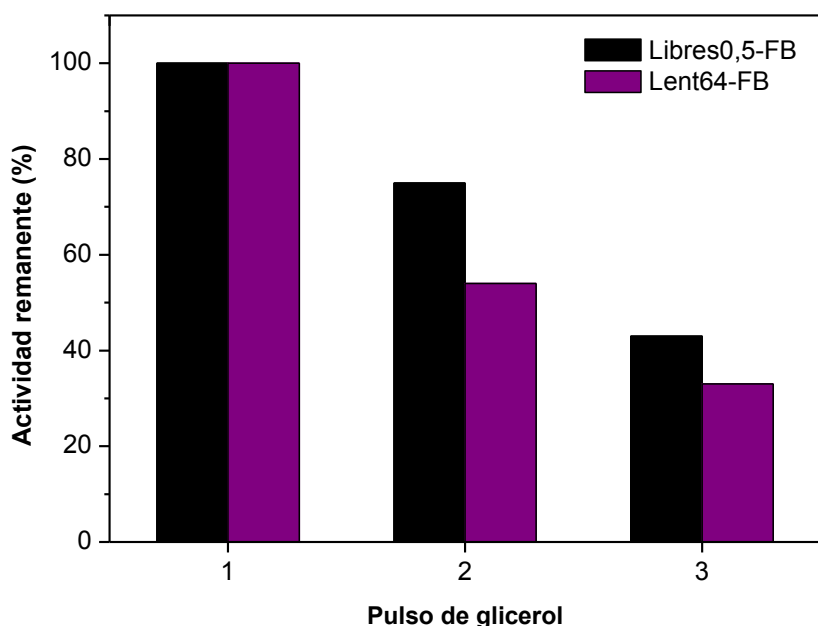


Figura 7.15. Representación gráfica de la actividad remanente tras cada pulso para los experimentos con células libres y con células inmovilizadas.

Con el objetivo de poder estimar de manera aproximada la cantidad de biomasa equivalente que puede haber en el experimento con células inmovilizadas, se ha calculado la actividad enzimática de los experimentos Lent64-FB y Libres0,5-FB a partir de la pendiente de los datos de concentración de DHA frente al tiempo al comienzo de la reacción, puesto que este dato no está influenciado por la inhibición por producto. Los ajustes se muestran en la Figura 7.16 y los resultados se recogen en la Tabla 7.23.

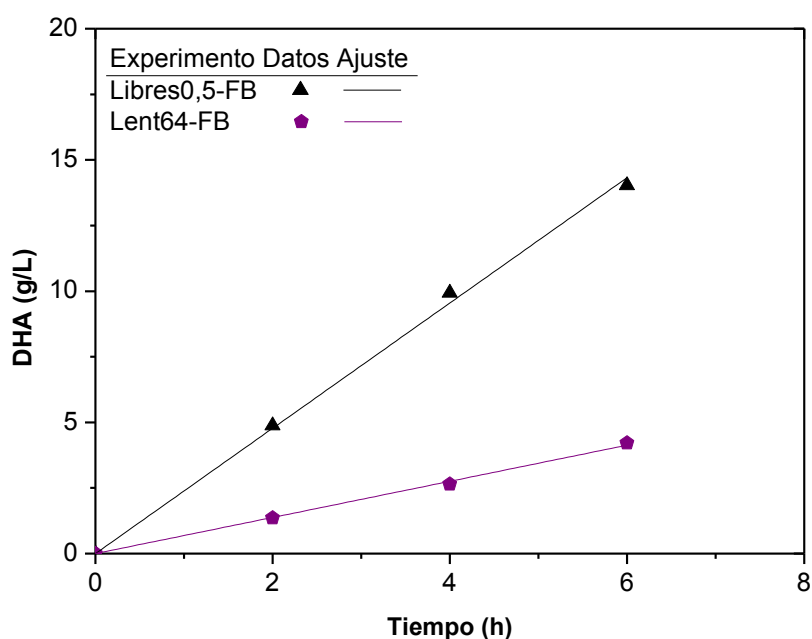


Figura 7.16. Representación de los ajustes lineales de los datos de concentración de DHA frente al tiempo para el cálculo de la actividad enzimática de los experimentos en modo fed-batch con células libres e inmovilizadas.

Tabla 7.23. Valores de actividad enzimática (a_0) para los experimentos en modo fed-batch con células libres e inmovilizadas.

Experimento	a_0 ($\text{g}_{\text{DHA}}/\text{L}\cdot\text{h}$)	r^2
Lent64-FB	0,69	0,999
Libres0,5-FB	2,39	0,998

En el apartado 4.3.2 se planteó una expresión empírica, obtenida a partir de los datos de los experimentos realizados en matraz *Erlenmeyer*, que relaciona la actividad enzimática y la concentración de biomasa para aquellos experimentos en los que la transferencia de oxígeno no es el factor limitante (ecuación [4.2]), como ocurre en este caso. Dicha expresión, aunque ha sido obtenida con datos de matraz *Erlenmeyer*, conduce a buenas estimaciones también en biorreactor, ya que, según la misma, una actividad enzimática de 2,39 g_{DHA}/L·h (dato del experimento Libres0,5-FB) corresponde a una concentración de biomasa de 0,48 g/L.

Por lo tanto, haciendo uso de la ecuación [4.2], una actividad enzimática de 0,69 g_{DHA}/L·h, como la obtenida en el experimento con LentiKats, debería corresponder a una concentración de biomasa total de 0,14 g/L. Este valor es muy bajo en comparación con la concentración de biomasa empleada en el experimento con células libres (0,5 g/L), lo que justificaría la lentitud con la que transcurre el proceso con células inmovilizadas y su mayor afectación por la presencia de DHA.

Dado que no se puede aumentar la densidad celular en el interior de las LentiKats, según lo expuesto en el apartado 7.1, la única manera de conseguir una mayor concentración de biomasa en el biorreactor es aumentando la concentración de LentiKats. Este estudio se va a llevar a cabo en el siguiente apartado.

7.4 ESTUDIO DE LA CONCENTRACIÓN DE LENTIKATS (STBR)

En este apartado se ha estudiado el efecto de la concentración de LentiKats introducida en el biorreactor sobre la actividad enzimática con el objetivo de aumentar la velocidad de producción con células inmovilizadas y obtener resultados comparables a los alcanzados con células libres. Para ello, se han adicionando cantidades crecientes de LentiKats al biorreactor (70-170 g/L), obtenidas según las directrices del apartado 7.1, dejándolas reaccionar durante 3 h para determinar la actividad enzimática. Se ha empleado una agitación de 560 rpm, una aireación de 1 vvm y un medio compuesto por 25 g/L de glicerol en tampón acetato para evitar una acumulación de DHA con efectos negativos. En todo momento se ha monitorizado la concentración de oxígeno disuelto para asegurar que no cae por debajo de la concentración crítica. La planificación experimental se muestra en la Tabla 7.24.

Tabla 7.24. Planificación experimental para el estudio del efecto de la concentración de LentiKats sobre la actividad enzimática en biorreactor.

Experimento	C _{Lent} (g/L)
Lent70	70
Lent90	90
Lent130	130
Lent150	150
Lent170	170

➤ Resultados experimentales

Los resultados experimentales de evolución de las concentraciones de DHA y glicerol con el tiempo se muestran en la Tabla 7.25 para los experimentos Lent70, Lent90 y Lent130, mientras que los resultados para los experimentos Lent150 y Lent170 se muestran en la Tabla 7.26. Asimismo, los datos de la evolución de la concentración de oxígeno disuelto con el tiempo se recogen en la Tabla 7.27.

Tabla 7.25. Resultados experimentales del estudio de la influencia de la concentración de LentiKats sobre la actividad enzimática en biorreactor (Lent70, Lent90 y Lent130).

Tiempo (h)	Lent70		Lent90		Lent130	
	Glicerol (g/L)	DHA producida (g/L)	Glicerol (g/L)	DHA producida (g/L)	Glicerol (g/L)	DHA producida (g/L)
0	28,03	0,00	25,52	0,00	22,17	0,00
1	27,24	0,69	24,61	0,80	21,05	1,06
2	26,49	1,35	23,73	1,53	20,06	2,08
3	25,75	2,06	22,71	2,34	18,69	3,39

Tabla 7.26. Resultados experimentales del estudio de la influencia de la concentración de LentiKats sobre la actividad enzimática en biorreactor (Lent150 y Lent170).

Tiempo (h)	Lent150		Lent170	
	Glicerol (g/L)	DHA producida (g/L)	Glicerol (g/L)	DHA producida (g/L)
0	18,48	0,00	13,47	0,00
1	17,06	1,28	12,02	1,40
2	15,67	2,46	10,82	2,67
3	14,17	3,71	9,15	4,07

Tabla 7.27. Evolución de la concentración de oxígeno disuelto para los estudios de producción de DHA con concentraciones crecientes de LentiKats en biorreactor.

Tiempo (min)	C _{O2} (%)	Tiempo (min)	C _{O2} (%)
0,0	100,0	406,75	35
1,3	85,3	407,00	36,5
1,8	78,9	407,25	35,4
3,0	70,2	408,00	34,9
4,0	68,1	411,00	34,8
10,8	68,9	414,00	35,1
12,8	70,1	417,00	34,3
18,0	69,5	420,00	33,6
30,0	70,3	450,00	35,5
42,0	69,3	480,00	35,2
60,0	68,3	510,00	36,4
96,3	66,0	522,00	33,2
114,0	68,2	528,00	34,6
120,0	65,9	555,00	33,1
126,0	65,0	570,00	32,1
144,0	66,1	588,00	32,7
150,0	63,7	594,00	33,5
168,0	63,0	600,00	32,1
180,0	62,1	606,00	34,1
198,0	57,3	612,00	33,8
204,0	56,4	619,50	31,8
210,0	56,4	630,00	31,4
216,0	55,4	660,00	30,2
228,0	55,1	672,00	30
234,0	54,9	690,00	31,1
252,0	54,6	702,00	31,8
264,0	52,2	720,00	30,1
270,0	52,6	732,00	31,4
291,0	52,3	771,00	30,3
300,0	53,0	780,00	29,6
324,0	51,1	792,00	29,6
336,0	49,4	810,00	28,9
342,0	47,9	822,00	29,8
360,0	46,2	834,00	28,6
369,0	45,6	852,00	28,9
374,0	43,8	870,00	28
374,3	41,3	912,00	27,9
374,5	40,0	924,00	28,2
375,0	39,8	984,00	27,3
378,0	35,6	990,00	27,5
381,0	38,0	1020,00	27

➤ Discusión de los resultados

En la Figura 7.17 se ha representado la evolución de la concentración de oxígeno disuelto con el tiempo tras la adición de cada una de las cantidades correspondientes de LentiKats, ya que este dato refleja si se está trabajando en condiciones limitantes de oxígeno. Como puede observarse en dicha figura, en ningún momento el oxígeno disuelto cae por debajo del nivel crítico (marcado con línea roja discontinua) por lo que la velocidad de aporte de oxígeno durante los experimentos fue suficiente.

Por otro lado, se observa una caída inicial muy pronunciada de la concentración de oxígeno disuelto como consecuencia de la inoculación del medio, como es habitual en este sistema, y pequeños escalones tras la adición de nuevas LentiKats al biorreactor. En especial, destaca la disminución de la concentración de oxígeno cuando la concentración de LentiKats aumenta hasta 130 g/L, que es el mayor aumento de concentración de biocatalizador que se ha realizado con respecto al valor anterior. En el resto de las adiciones, la disminución de la concentración de oxígeno disuelto es menos acusada.

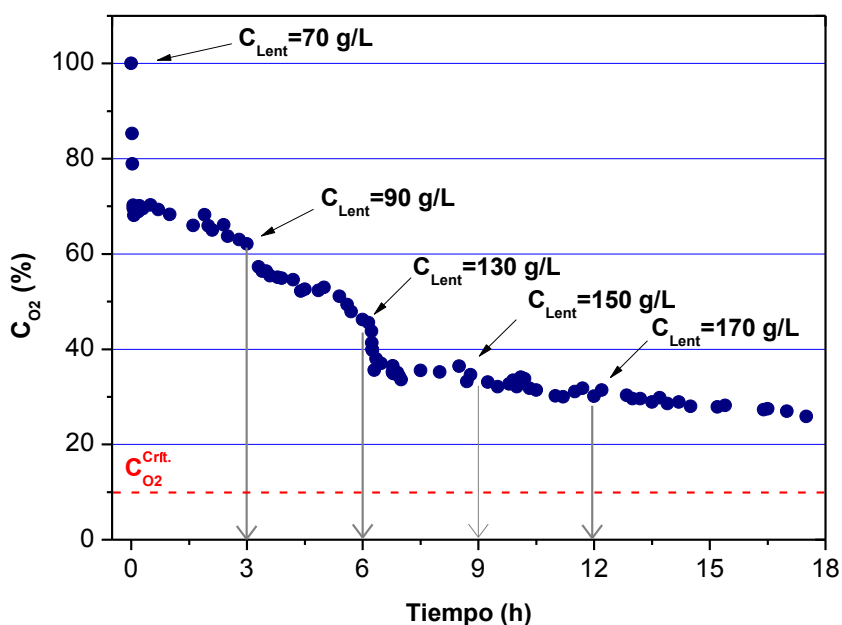


Figura 7.17. Evolución de la concentración de oxígeno disuelto a lo largo del experimento con sucesivas adiciones de LentiKats.

Una vez confirmado que los experimentos han transcurrido sin problemas de transferencia de oxígeno gas-líquido, se ha calculado la actividad enzimática en cada caso a partir de la pendiente de las rectas de concentración de DHA frente al tiempo, como muestra la Figura 7.18. Los resultados de actividad enzimática y la bondad de los ajustes se presentan en la Tabla 7.28.

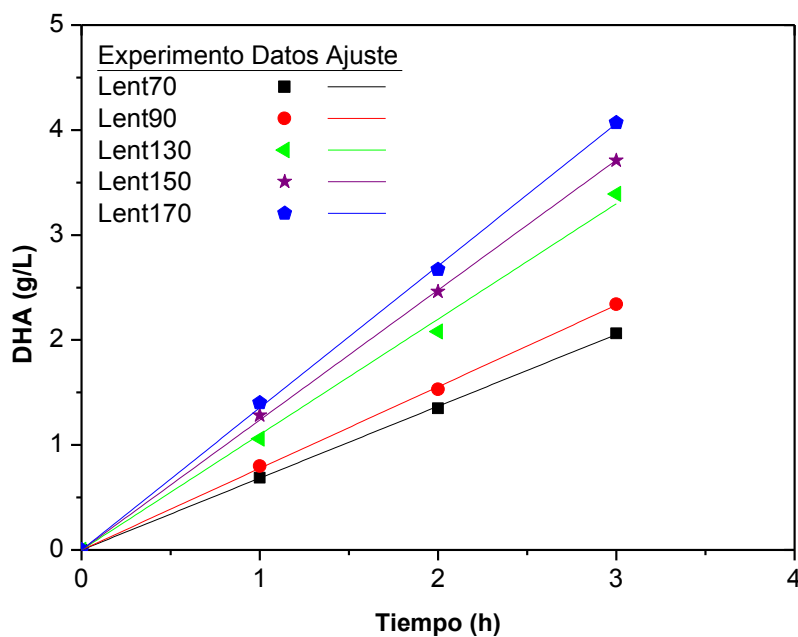


Figura 7.18. Representación de los ajustes lineales de los datos de concentración de DHA frente al tiempo para el cálculo de la actividad enzimática obtenida con cada adición al biorreactor de diferentes cantidades de LentiKats.

Tabla 7.28. Valores de actividad enzimática (a_0) para los experimentos realizados con distintas concentraciones de LentiKats.

Experimento	a_0 ($\text{g}_{\text{DHA}}/\text{L}\cdot\text{h}$)	r^2
Lent70	0,68	0,999
Lent90	0,78	0,999
Lent130	1,10	0,998
Lent150	1,24	0,999
Lent170	1,35	0,999

Representando en la Figura 7.19 las actividades enzimáticas obtenidas frente a la concentración de LentiKats, se observa que la relación entre ambas magnitudes es lineal. Esto es, la actividad enzimática es proporcional a la concentración de LentiKats en el medio, como cabría esperar. De hecho, la constante de proporcionalidad en biorreactor mostrada en la ecuación [7.6] es muy similar a la obtenida en matraz *Erlenmeyer*, según la ecuación [7.1]. Esta analogía confirma que en los experimentos realizados en matraz *Erlenmeyer* (sin monitorización de la concentración de oxígeno disuelto) la velocidad de transferencia de oxígeno no ha sido un factor limitante.

No obstante, para obtener resultados de actividad enzimática similares a los logrados con 0,5 g/L de células libres, se necesitaría operar con una concentración de LentiKats de 288 g/L, de acuerdo con la ecuación [7.6]. Esta cantidad de LentiKats resulta muy laboriosa de obtener a escala de laboratorio, aunque a escala piloto sería perfectamente factible, según el esquema de proceso mostrado en la Figura 7.1 (a).

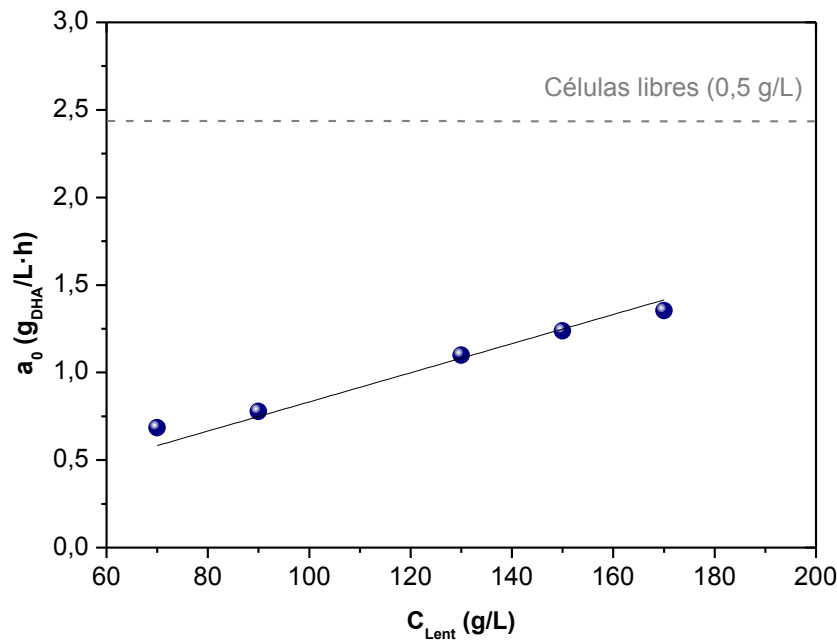


Figura 7.19. Influencia de la concentración de LentiKats en el biorreactor sobre la actividad enzimática.

$$a_0 \left(\frac{g_{DHA}}{L \cdot h} \right) = 0,0083 \cdot C_{Lent} \left(\frac{g}{L} \right) \quad r^2 = 0,996 \quad [7.6]$$

Asumiendo que $a_0 \approx R_{DHA} \approx P_v$ (lo que correspondería, según se determinó en el Capítulo anterior, a una limitación de la velocidad del proceso debida a la transferencia de oxígeno, lo que en este caso no es del todo cierto), se pueden comparar los valores obtenidos con los hallados en bibliografía. Así, se observa que el valor experimental más alto de productividad volumétrica obtenido (1,35 g/L·h) es mayor que los valores mostrados en la Tabla 7.1 para los procesos realizados en *resting cells* (Yamada y col., 1979; Lidia y Stanislaw, 2012). Sin embargo, este valor dista bastante del resultado obtenido por Hekmat y col. (2007) (3,7 g/L·h). Esto es debido a que en el mencionado estudio el proceso se llevó a cabo con un medio rico en nutrientes (con las células en crecimiento) y parte de la biomasa se encontraba libre en el caldo (un 35 % del total). Por lo tanto, ese valor de productividad resultante mostrado en la Tabla 7.1 es la suma de las productividades de las células libres e inmovilizadas y no es comparable con el obtenido en los procesos en los que únicamente se trabaja con células inmovilizadas en estado de *resting cells*, como el aquí descrito.

Es habitual que algunas células inmovilizadas se liberen del soporte por acción de la agitación y ante un medio rico en nutrientes se reproduzcan hasta el punto de generar una alta concentración de células libres en el medio. Así se ha constatado en este trabajo durante los experimentos de preparación del biocatalizador con medio complejo (apartado 7.1) y se ha manifestado en varios estudios previos (Adlercreutz y col., 1985; Hekmat y col., 2007). Desde el punto de vista operacional, la presencia de células libres en el caldo invalida la principal ventaja asociada a la producción con células inmovilizadas como es la facilidad de separación. Además, trabajar con medios ricos en nutrientes dificulta la purificación posterior del producto y puede dar lugar a contaminaciones indeseadas con microorganismos ajenos. Por ello, desde esta perspectiva, no tiene mucho sentido trabajar con células inmovilizadas en crecimiento. Presenta un mayor interés el desarrollo de un proceso productivo con células inmovilizadas en estado de *resting cells*, como el que se ha descrito y desarrollado en este Capítulo.

Con todo, a pesar de que los resultados obtenidos en *resting cells* son algo mejores que los bibliográficos, se consideran insuficientes en comparación con los resultados logrados con células libres.

Para discernir si los resultados con células inmovilizadas son peores debido a que se ha alcanzado poca densidad celular en el interior de las partículas (aunque esta afirmación es difícil de sostener según las imágenes mostradas en la Figura 7.6), se ha realizado un análisis elemental (C, H, N y S) de las LentiKats, de la biomasa libre y del gel empleado para la fabricación de LentiKats, en el Centro de Asistencia a la Investigación (CAI) de Microanálisis Elemental de la UCM, para tratar de estimar la cantidad de biomasa presente en el interior de las LentiKats en función de la composición relativa. Para llevar a cabo estos análisis, las lentiKats obtenidas tras dos etapas de crecimiento en medio complejo se han lavado varias veces con agua ultrapura para eliminar posibles restos de nitrógeno procedentes del medio: de manera similar se ha procedido con las células libres. Las distintas muestras se molieron hasta homogeneización antes del análisis elemental. Además, se analizaron varias muestras de cada tipo para minimizar la desviación que pudieran tener los resultados, reduciendo así el error experimental. En la Tabla 7.29 se muestran los porcentajes de C, H, N y S de cada muestra.

Tabla 7.29. Resultados del análisis elemental de varias muestras de LentiKats, biomasa libre y gel de LentiKats sin inocular.

Muestra	C (%)	H (%)	N (%)	S (%)
LentiKats 1	50,97	8,58	0,43	0,04
LentiKats 2	51,11	8,46	0,41	0,03
LentiKats 3	51,30	8,63	0,50	0,01
LentiKats 4	51,71	8,53	0,71	0,04
Valores medios	51,27	8,55	0,51	0,03
Biomasa libre 1	39,51	6,14	11,11	0,41
Biomasa libre 2	40,36	6,26	11,27	0,40
Valores medios	39,94	6,20	11,19	0,41
Gel LentiKats-1	51,41	8,63	0,12	0,02
Gel LentiKats-2	51,13	8,54	0,11	0,02
Valores medios	51,27	8,59	0,12	0,02

En esta tabla se observa que casi la totalidad del nitrógeno contenido en las LentiKats se debe a la biomasa, ya que el gel de partida no contiene apenas este elemento. Por ello, los datos medios de contenido en nitrógeno se van a emplear para la estimación de la cantidad de biomasa presente en las LentiKats como sigue:

$$C_X^{Lent} \left(\frac{g_X}{g_{Lent}} \right) = \frac{(gN_{Lent} - gN_{Gel})}{100g_{Lent}} \cdot \frac{100g_X}{gN_X} \quad [7.7]$$

Mediante este cálculo se obtiene una estimación de la cantidad de biomasa que presentan las LentiKats de **35 mgX/g_{Lent}**. Este dato permite el cálculo de la concentración de biomasa con la que se ha trabajado en cada uno de los experimentos. En la Tabla 7.30 se muestra una comparativa entre los datos obtenidos para las células inmovilizadas y el experimento con células libres. En esta tabla se observa claramente que se ha trabajado con una elevada concentración de biomasa en los experimentos con las células inmovilizadas (10 veces superior a la concentración de biomasa en el experimento con células libres), como se pretendía, pero que esto no se ha traducido en un aumento de la actividad enzimática, originando valores de actividad específica (a_0^S) realmente bajos. Dado que la velocidad de transferencia de oxígeno gas-líquido ha sido suficiente en todos los casos (Figura 7.17), es de suponer que con este nivel de agitación no hay limitaciones por el transporte en la difusión externa (líquido-sólido). Por tanto, este hecho sólo puede deberse a problemas de difusión interna en los poros de la partícula, esto es, a que los nutrientes no estén llegando a la biomasa situada en el interior de las partículas (Adlercreutz y col., 1985).

Una forma de comprobar la influencia de la difusión en los poros es mediante el criterio de Weisz-Prater, a partir del cálculo del número adimensional N_{W-P} definido por la ecuación [7.8].

$$N_{W-P} = \frac{r_{obs} \cdot d_p^2}{D_e \cdot C_j^0} \quad [7.8]$$

donde: r_{obs} es la velocidad de desaparición de reactivo j (mol/L·s), d_p es el diámetro de partícula del catalizador (m), D_e es el coeficiente de difusión efectivo (m²/s) y C_j^0 es la concentración inicial de reactivo (mol/L). Este criterio establece que si $N_{W-P} < 0,3$, las limitaciones por transferencia de materia interna son insignificantes (Vannice y Joyce, 2005).

La velocidad de desaparición de glicerol se ha calculado a partir de la pendiente de las rectas concentración de glicerol-tiempo a través de los ajustes que se muestran en la Figura 7.20. Los resultados obtenidos se recogen en la Tabla 7.31. Con los datos de dicha tabla y la ecuación [7.8] se puede calcular el módulo de Weisz-Prater para cada

experimento, teniendo en cuenta que el diámetro de partícula es de 3,5 mm y el coeficiente de difusión efectivo se va a considerar que tiene un valor de $3,6 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ por analogía con el dato obtenido en el estudio realizado con LentiKats por Schenkmayrová y col. (2014). Los resultados se muestran en la Tabla 7.32; como era de esperar, no se cumple el criterio de Weisz-Prater, por tanto, las limitaciones por transferencia de materia interna son considerables. Esto significa que probablemente sólo estén contribuyendo a mejorar la velocidad de reacción las bacterias inmovilizadas cercanas a la superficie de la partícula, lo que explicaría por qué la actividad enzimática es menor de lo esperado a pesar del incremento de la densidad celular en el biorreactor (Tabla 7.30).

Tabla 7.30. Comparativa entre la actividad enzimática y la concentración de biomasa en los experimentos con células inmovilizadas y libres.

Experimento	Biomasa	a_0 ($\text{g}_{\text{DHA}}/\text{L} \cdot \text{h}$)	C_X (g/L)	a_0^S ($\text{g}_{\text{DHA}}/\text{g}_{\text{Biocat}} \cdot \text{h}$)
Lent70	Inmovilizada	0,68	2,45	0,28
Lent90	Inmovilizada	0,78	3,15	0,25
Lent130	Inmovilizada	1,1	4,55	0,24
Lent150	Inmovilizada	1,24	5,25	0,24
Lent170	Inmovilizada	1,35	5,95	0,23
Libres0,5-FB	Libre	2,39	0,5	4,78

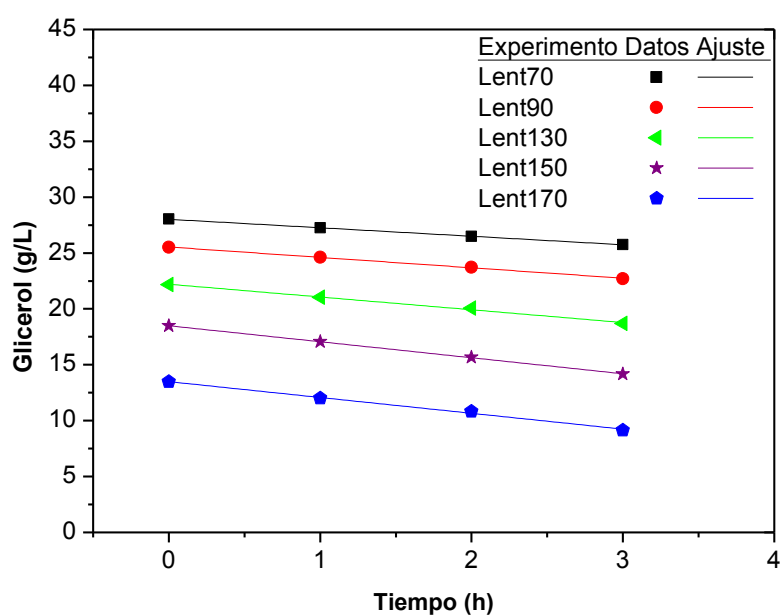


Figura 7.20. Representación de los ajustes lineales de los datos de concentración de glicerol frente al tiempo para el cálculo de la velocidad de desaparición del glicerol para cada una de las concentraciones de LentiKats estudiada.

Tabla 7.31. Valores de velocidad de desaparición de glicerol ($-R_{Glic}$) para los experimentos realizados con distintas concentraciones de LentiKats.

Experimento	$-R_{Glic}$ ($g_{Glic}/L \cdot h$)	r^2
Lent70	0,76	0,999
Lent90	0,93	0,998
Lent130	1,14	0,993
Lent150	1,43	0,999
Lent170	1,42	0,994

Tabla 7.32. Valores del módulo de Weisz-Prater obtenido para cada experimento.

Experimento	r_{obs} ($mol_{Glic}/L \cdot s$)	C_{Glic}^0 (mol/L)	N_{P-W}
Lent70	2,29E-06	0,30	2,6
Lent90	2,81E-06	0,28	3,4
Lent130	3,45E-06	0,24	4,9
Lent150	4,32E-06	0,20	7,3
Lent170	4,27E-06	0,15	9,9

Este análisis pone de relieve la principal limitación del empleo de células inmovilizadas en LentiKats en el proceso de producción de DHA a partir de glicerol con *G. oxydans*. Es posible que el efecto tan acusado de inhibición por producto detectado tras cada pulso en el experimento en modo *fed-batch* del apartado 7.3 tenga que ver con una acumulación de DHA en el interior de los poros. Futuras investigaciones deberán encaminarse a la mejora de la difusión interna modificando el tamaño y/o distribución de los poros del soporte a emplear en la inmovilización.

7.5 BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Adlercreutz, P., Holst, O., Mattiasson, B. 1985. Characterization of *Gluconobacter oxydans* immobilized in calcium alginate. *Applied microbiology and biotechnology*, **22**(1), 1-7.
- Bauer, R., Katsikis, N., Varga, S., Hekmat, D. 2005. Study of the inhibitory effect of the product dihydroxyacetone on *Gluconobacter oxydans* in a semi-continuous two-stage repeated-fed-batch process. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, **28**(1), 37-43.
- Black, C.S. 2013. Bioconversion of glycerol to dihydroxyacetone by immobilized *Gluconacetobacter xylinus* cells. *International Journal of Chemical Engineering and Applications*, **4**(5).
- Bories, A., Claret, C., Soucaille, P. 1991. Kinetic-study and optimization of the production of dihydroxyacetone from glycerol using *Gluconobacter oxydans*. *Process Biochemistry*, **26**(4), 243-248.
- Cassidy, M.B., Lee, H., Trevors, J.T. 1996. Environmental applications of immobilized microbial cells: A review. *Journal of Industrial Microbiology*, **16**(2), 79-101.
- Claret, C., Bories, A., Soucaille, P. 1992. Glycerol inhibition of growth and dihydroxyacetone production by *Gluconobacter oxydans*. *Current Microbiology*, **25**(3), 149-155.
- Deppenmeier, U., Hoffmeister, M., Prust, C. 2002. Biochemistry and biotechnological applications of *Gluconobacter* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **60**(3), 233-242.
- Dikshit, P.K., Moholkar, V.S. 2016a. Kinetic analysis of dihydroxyacetone production from crude glycerol by immobilized cells of *Gluconobacter oxydans* MTCC 904. *Bioresource Technology*, **216**, 948-957.
- Dikshit, P.K., Moholkar, V.S. 2016b. Optimization of 1, 3-dihydroxyacetone production from crude glycerol by immobilized *Gluconobacter oxydans* MTCC 904. *Bioresource technology*, **216**, 1058-1065.

- Freeman, A., Lilly, M.D. 1998. Effect of processing parameters on the feasibility and operational stability of immobilized viable microbial cells. *Enzyme and Microbial Technology*, **23**(5), 335-345.
- Gungormusler-Yilmaz, M., Cicek, N., Levin, D.B., Azbar, N. 2016. Cell immobilization for microbial production of 1, 3-propanediol. *Critical reviews in biotechnology*, **36**(3), 482-494.
- Hekmat, D., Bauer, R., Fricke, J. 2003. Optimization of the microbial synthesis of dihydroxyacetone from glycerol with *Gluconobacter oxydans*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, **26**(2), 109-116.
- Hekmat, D., Bauer, R., Neff, V. 2007. Optimization of the microbial synthesis of dihydroxyacetone in a semi-continuous repeated-fed-batch process by in situ immobilization of *Gluconobacter oxydans*. *Process Biochemistry*, **42**(1), 71-76.
- Hu, Z.-C., Zheng, Y.-G., Shen, Y.-C. 2010. Dissolved-oxygen-stat fed-batch fermentation of 1,3-dihydroxyacetone from glycerol by *Gluconobacter oxydans* ZJB09112. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, **15**(4), 651-656.
- Izuo, N., Nabe, K., Yamada, S., Chibata, I. 1980. Studies on aerobic fermentation .7. Production of dihydroxyacetone by continuous cultivation of *Acetobacter suboxydans*. *Journal of Fermentation Technology*, **58**(3), 221-226.
- Krasňan, V., Stloukal, R., Rosenberg, M., Rebroš, M. 2016. Immobilization of cells and enzymes to lentikats®. *Applied microbiology and biotechnology*, **100**(6), 2535-2553.
- Lidia, S.-R., Stanislaw, B. 2012. Production of dihydroxyacetone from an aqueous solution of glycerol in the reaction catalyzed by an immobilized cell preparation of acetic acid bacteria *Gluconobacter oxydans* ATCC 621. *European Food Research and Technology*, **235**(6), 1125-1132.
- Nabe, K., Izuo, N., Yamada, S., Chibata, I. 1979. Conversion of glycerol to dihydroxyacetone by immobilized whole cells of *Acetobacter xylinum*. *Applied and Environmental Microbiology*, **38**(6), 1056-1060.

- Ohrem, H.L., Voss, H. 1996. Process model of the oxidation of glycerol with *Gluconobacter oxydans*. *Process Biochemistry*, **31**(3), 295-301.
- Pessela, B.C.C., Mateo, C., Fuentes, M., Vian, A., García, J.L., Carrascosa, A.V., Guisán, J.M., Fernández-Lafuente, R. 2003. The immobilization of a thermophilic β -galactosidase on sephabeads supports decreases product inhibition: Complete hydrolysis of lactose in dairy products. *Enzyme and Microbial Technology*, **33**(2), 199-205.
- Raska, J., Skopal, F., Komers, K., Machek, J. 2007. Kinetics of glycerol biotransformation to dihydroxyacetone by immobilized *Gluconobacter oxydans* and effect of reaction conditions. *Collection of Czechoslovak Chemical Communications*, **72**(9), 1269-1283.
- Rocha-Martin, J., Acosta, A., Berenguer, J., Guisan, J.M., Lopez-Gallego, F. 2014. Selective oxidation of glycerol to 1, 3-dihydroxyacetone by covalently immobilized glycerol dehydrogenases with higher stability and lower product inhibition. *Bioresource technology*, **170**, 445-453.
- Rodríguez-Nogales, J.M., Vila-Crespo, J., Fernández-Fernández, E. 2013. Immobilization of *Oenococcus oeni* in lentikats® to develop malolactic fermentation in wines. *Biotechnology progress*, **29**(1), 60-65.
- Schenkmayerová, A., Bučko, M., Gemeiner, P., Treľová, D., Lacík, I., Chorvát, D., Ačai, P., Polakovič, M., Lipták, L., Rebroš, M. 2014. Physical and bioengineering properties of polyvinyl alcohol lens-shaped particles versus spherical polyelectrolyte complex microcapsules as immobilisation matrices for a whole-cell baeyer-villiger monooxygenase. *Applied biochemistry and biotechnology*, **174**(5), 1834-1849.
- Schlieker, M., Vorlop, K.-D. 2006. A novel immobilization method for entrapment: Lentikats®. *Immobilization of enzymes and cells*, 333-343.
- Sievers, M., Schafer, S., Jahnz, U., Schlieker, M., Vorlop, K. 2002. Significant reduction of energy consumption for sewage treatment by using lentikat® encapsulated nitrifying bacteria. *Landbauforsch Volk*, **241**, 81-86.

- Sievers, M., Vorlop, K.-D., Hahne, J., Schlieker, M., Schäfer, S. 2003. Advanced nitrogen elimination by encapsulated nitrifiers. *Water Science and Technology*, **48**(8), 19-26.
- Vannice, M.A., Joyce, W.H. 2005. *Kinetics of catalytic reactions*. Springer.
- Wei, S., Song, Q., Wei, D. 2007. Repeated use of immobilized *Gluconobacter oxydans* cells for conversion of glycerol to dihydroxyacetone. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, **37**(1), 67-76.
- Yamada, S., Nabe, K., Izuo, N., Chibata, I. 1979. Studies on aerobic fermentation .5. Enzymatic production of dihydroxyacetone by *Acetobacter suboxydans* ATCC-621. *Journal of Fermentation Technology*, **57**(3), 221-226.
- Zheng, X.-j., Jin, K.-q., Zhang, L., Wang, G., Liu, Y.-P. 2016. Effects of oxygen transfer coefficient on dihydroxyacetone production from crude glycerol. *brazilian journal of microbiology*, **47**(1), 129-135.
- Zhou, X., Zhou, X., Xu, Y., Yu, S. 2016. Improving the production yield and productivity of 1, 3-dihydroxyacetone from glycerol fermentation using *Gluconobacter oxydans*. *Bioprocess and biosystems engineering*, **39**(8), 1315-1318.

CAPÍTULO 8.

RESUMEN, CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CAPÍTULO 8.

RESUMEN, CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Índice

8.1	RESUMEN.....	369
8.2	CONCLUSIONES	376
8.3	RECOMENDACIONES.....	383

CAPÍTULO 8.

RESUMEN, CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

8.1 RESUMEN

En el contexto energético actual, existe un interés creciente por reemplazar los combustibles fósiles por fuentes de energía renovables más sostenibles con el medioambiente, ilimitadas y disponibles para satisfacer la demanda energética de las sociedades actuales sin comprometer la capacidad de las generaciones venideras para satisfacer sus propias necesidades.

En la Unión Europea, el sector que mayor demanda energética presenta es el sector transportes, contribuyendo en un 33 % al consumo total de energía. Por este motivo, desde el marco legislativo europeo se han implementado políticas dirigidas a fomentar el empleo de biocombustibles, siendo el biodiésel el biocarburante más atractivo porque su uso no requiere ninguna modificación en el motor diésel. Así, alentada por un marco regulatorio favorable, la producción de biodiésel en la Unión Europea se ha disparado en los últimos 10 años.

El biodiésel se produce principalmente a través de una reacción de transesterificación de los triglicéridos presentes en aceites vegetales. Este biocarburante es no tóxico, biodegradable y libre de compuestos azufrados y aromáticos. Además, presenta un ciclo teórico de carbono cerrado, siendo la cantidad de CO₂ liberada tras su combustión la misma que han fijado previamente los vegetales durante su crecimiento. Sin embargo, como resultado de la reacción de transesterificación, se genera de manera ineludible glicerol, en cantidades de hasta un 10 % en peso. Por ello, el auge en la producción de biodiésel ha supuesto la saturación del mercado de la glicerina, de modo que la sobreoferta de este producto ha conducido a una caída en sus precios de tal calibre que, en la actualidad, se considera un residuo industrial, sin ningún valor añadido. Por esta razón, resulta imprescindible la revalorización de este compuesto, mediante la búsqueda de nuevos usos indirectos, para hacer el proceso de producción de biodiésel más competitivo y más sostenible.

La naturaleza reactiva del glicerol le hace muy interesante como *platform chemical* para la síntesis de numerosos intermedios y compuestos finales de especial relevancia en la industria química. Asimismo, por su carácter no tóxico, es apto para su uso como sustrato en procesos biocatalíticos, por lo que su transformación en compuestos de alto valor añadido se puede llevar a cabo por vía química y por vía biocatalítica. De entre todos los compuestos de interés industrial que pueden sintetizarse a partir de glicerol, destaca la dihidroxiacetona por constituir el principio activo de las cremas autobronceadoras y ser un buen precursor para la síntesis de fármacos contra el cáncer y polímeros biocompatibles para uso quirúrgico.

Tras el análisis realizado en el Apartado 1.5.2, se concluyó que la revalorización de glicerol a DHA resulta más ventajosa por vía biotecnológica que por vía química porque el rendimiento y la selectividad son mayores, las condiciones de operación más suaves y no requiere el uso de compuestos tóxicos y peligrosos, siendo *Gluconobacter oxydans* el biocatalizador que mejores resultados reporta.

El desarrollo de la vía biotecnológica o bioproceso de revalorización se puede dividir en dos fases; una primera relativa a la producción del producto o *upstream* que comprende varias etapas, entre las que se encuentran el estudio del medio de cultivo, el estudio de las condiciones y modos de operación y la obtención de un modelo cinético predictivo del sistema y una segunda fase relativa al aislamiento y purificación del producto o *downstream*. En esta Tesis Doctoral se marcó como objetivo el desarrollo del bioproceso de revalorización de glicerol a DHA con *G. oxydans* como biocatalizador, en su fase de *upstream*. Para ello, se realizaron los estudios que se detallan a continuación.

En primer lugar, se realizó un estudio sobre el medio de cultivo y su influencia en la producción de DHA. Dado que la adición de fuente de nitrógeno orgánico al medio de cultivo es necesaria para favorecer la síntesis de la enzima glicerol deshidrogenasa (responsable de la biotransformación) durante el crecimiento del microorganismo, se llevó a cabo un análisis del efecto de la adición de distintas concentraciones de extracto de levadura y peptona con el objetivo de minimizar su empleo en la formulación del medio por economía del proceso. Para ello, se realizaron 7 experimentos variando la concentración de fuente de nitrógeno orgánica entre 0 y 8 g/L. Los resultados revelaron que el aumento de la concentración de fuente compleja

conducía, como es lógico, a una mayor producción de biomasa y, como consecuencia, a una mayor producción de ácido glicérico (principal subproducto de la biotransformación), pero, sorprendentemente, el incremento en la concentración de biomasa no se traducía en un aumento proporcional de la velocidad de producción de DHA, como cabría esperar, al haber más microorganismos productores en el medio. Tras analizar el efecto de la concentración de biomasa sobre la actividad enzimática, se determinó que existía un fenómeno limitante no identificado cuando se trabajaba con concentraciones de biomasa elevadas. Por otro lado, en este estudio se dedujo que la actividad enzimática podía evaluarse directamente como la velocidad inicial de producción de DHA.

En cuanto a la concentración de glicerol en el medio, se realizaron 7 experimentos en el intervalo de concentraciones de 25 a 133 g/L. No se apreció ningún fenómeno de inhibición por sustrato, ya que la velocidad inicial de producción de DHA o actividad enzimática era idéntica para todos los experimentos. No obstante, el aumento de la concentración de glicerol conducía a una mayor producción de ácido glicérico, con la consiguiente bajada en el valor de pH del caldo de reacción. Este efecto permitió identificar que para valores de pH por debajo de 4 se producía la inhibición total del proceso. Asimismo, el aumento de la concentración de DHA obtenido al emplear una mayor concentración inicial de glicerol permitió vislumbrar una ralentización en la velocidad de producción, sugiriendo una fuerte inhibición por producto. Posteriormente, se confirmó el fenómeno de inhibición por producto a través de la realización de 4 experimentos con diferentes concentraciones iniciales de DHA entre 0 y 90 g/L, detectándose que además de la concentración de DHA, el tiempo de exposición también influye negativamente en la velocidad de producción. Adicionalmente, mediante la adaptación del modelo de Hinshelwood a este proceso, se pudo determinar la concentración de DHA máxima, a partir de la cual, el proceso cesa totalmente (159 g/L).

Para determinar la posibilidad de emplear directamente glicerol crudo, se realizaron 7 experimentos comparativos con distintas concentraciones de glicerol puro y glicerol crudo, suministrado por Biocom Energía S.L, en los que se pudo confirmar que para concentraciones de 30 g/L de glicerol, no existen grandes diferencias en la velocidad de producción de DHA, aunque la concentración final de biomasa alcanzada es mayor en el caso del glicerol crudo, probablemente debido a su elevado contenido en

fosfatos y otras sales. No obstante, también se detectó la inconveniencia de usar concentraciones más elevadas de glicerol crudo porque la acumulación de impurezas implica una disminución de la velocidad de producción y una mayor acumulación de subproducto.

A continuación, se estudió la influencia de las condiciones de operación (temperatura, pH, agitación y porcentaje de inóculo) sobre la producción de DHA. Para el estudio de la temperatura se realizaron 6 experimentos variando esta magnitud entre 25 °C y 37 °C, determinándose que la temperatura óptima es 30 °C porque maximiza la productividad volumétrica y la actividad enzimática. En cuanto al pH, se probaron varias estrategias incluida la evolución libre y en escalón, sin diferencias aparentes en la velocidad de producción. Sin embargo, se detectó que valores iniciales de pH más altos conducían a una mayor producción de subproducto. En este sentido, se determinó la idoneidad de trabajar con valores de pH bajos, en torno a 5, para minimizar la producción de subproducto, aunque sin dejar que dicho valor descienda a valores menores de 4 para evitar la inhibición del proceso.

El estudio simultáneo del porcentaje de inóculo (5-40 %) y la agitación (100-400 rpm), realizado a partir de 12 experimentos, reveló que el factor limitante en este proceso es el aporte de oxígeno por célula (agitación inadecuada). Cuando este aporte es insuficiente, la actividad enzimática no aumenta proporcionalmente a la concentración de biomasa; es decir, no se produce el aumento en la velocidad de producción esperado. No obstante, este factor no afecta ni al crecimiento de la biomasa, ni a la producción de subproducto.

Con respecto al modo de operación, se estudió el proceso de producción de DHA con las células en estado de reposo o *resting cells*, es decir, sin ninguna fuente compleja en el medio de producción para evitar el crecimiento celular, porque resulta más ventajoso desde el punto de vista de la separación y purificación posterior del producto (*downstream*) y desde el punto de vista operacional, ya que permite llevar a cabo la operación en condiciones no estériles. Para ello, se realizaron 13 experimentos donde se probaron diversos tampones para amortiguar la caída del pH y evitar la inhibición del proceso, con diferentes concentraciones de biomasa, ya que el aumento de la concentración de biomasa implica mayor producción de ácido glicérico. Los mejores resultados de obtuvieron con el tampón acetato, capaz de evitar la caída del pH

por debajo de 4 incluso en el experimento con mayor concentración de biomasa. Asimismo, se estudió de manera sistemática, a través de 24 experimentos, la influencia simultánea de la concentración de biomasa (0,01-1 g/L) y la agitación (100-400 rpm) sobre la actividad enzimática, de modo que, con los resultados obtenidos, fue posible la formulación de un modelo matemático basado en la ecuación de Michaelis-Menten, capaz de predecir de manera satisfactoria la actividad enzimática en función de las dos variables más importantes en este proceso: la concentración de biomasa y el coeficiente de transporte de oxígeno (k_{La}).

Dado que los experimentos anteriores se realizaron en matraz *Erlenmeyer* sin posibilidad de medir la concentración de oxígeno disuelto, se decidió ampliar el estudio a través de 7 experimentos de producción de DHA con células en *resting cells* en biorreactor STBR a distintas agitaciones (300-900 rpm), ya que estos dispositivos permiten el registro de los valores de oxígeno disuelto en el caldo y la composición del gas de salida para poder establecer balances de materia y determinar las velocidades de transporte de oxígeno (OTR), consumo de oxígeno (OUR) y consumo específico (q_{O_2}). Los resultados mostraron que el proceso está controlado por la transferencia de oxígeno cuando $k_{La} < 0,0142 \text{ s}^{-1}$, ya que para esta condición se observa un aumento lineal tanto de la actividad enzimática como de q_{O_2} con k_{La} . También se determinó que la concentración de oxígeno disuelto debe ser superior al 10 % con respecto al valor de saturación para evitar que el proceso esté controlado por la transferencia de oxígeno. Por otro lado, al contabilizar el número de colonias viables se observó una disminución del número de células viables con el tiempo, en especial a agitaciones altas, lo que indica estrés hidrodinámico. Sin embargo, este descenso en el número de viables no afecta perceptiblemente a la actividad enzimática debido a la robustez de la enzima glicerol deshidrogenasa situada en la membrana celular. En este estudio también se demostró que la producción de ácido glicérico no depende del aporte de oxígeno, sino únicamente del tiempo de reacción.

Con los datos recopilados en el estudio anterior para la producción de DHA en *resting cells* se formuló un modelo cinético no estructurado-no segregado de orden 0 para los experimentos realizados en matraz *Erlenmeyer*, basado en la suposición de que la etapa controlante es la transferencia de oxígeno. El buen ajuste de dicho modelo a los

datos experimentales confirmó que, en efecto, en los experimentos realizados en matraz la etapa controlante es la transferencia de oxígeno.

De igual forma, el exhaustivo análisis del transporte y consumo de oxígeno realizado para los experimentos en *resting cells* en biorreactor permitió formular sendos modelos cinéticos para los experimentos controlados por la velocidad transferencia de oxígeno ($k_{La} < 0,0142s^{-1}$) y para los experimentos controlados por la velocidad de la biotransformación ($k_{La} > 0,0142 s^{-1}$). En el primer caso, se planteó un modelo cinético análogo al propuesto para los experimentos en matraz *Erlenmeyer* pero particularizado para los experimentos en biorreactor, ya que en este último caso, se disponía de datos de concentración de oxígeno disuelto y no era necesario establecer ninguna suposición. En el segundo caso, dado que la velocidad del proceso está determinada por la velocidad de la reacción bioquímica y que ésta es consecuencia de la acción de la enzima glicerol deshidrogenasa situada en la membrana, se planteó un modelo basado en la cinética de Michaelis-Menten. En ambos casos, los modelos propuestos reprodujeron con éxito la evolución del glicerol y de la DHA con el tiempo para todos los experimentos.

Por comparación entre los valores de k_{La} y de velocidad de producción de DHA obtenidos para los experimentos en matraz *Erlenmeyer* y biorreactor cuando controla la velocidad de transferencia de oxígeno, se detectó que los valores de k_{La} calculados para los experimentos en matraz estaban sobreestimados, probablemente debido a que la ecuación empírica empleada para su estimación no contempla la resistencia adicional al transporte de oxígeno que supone el uso de un tapón de algodón en el cuello del matraz para asegurar esterilidad.

Finalmente, para tratar de paliar el efecto de inhibición por producto y el estrés hidrodinámico, aumentar la densidad celular en el biorreactor y facilitar la separación y reutilización del biocatalizador, se realizaron unos estudios preliminares sobre la posibilidad de operar con las células inmovilizadas (protegidas) en LentiKats. Para ello, en primer lugar se realizaron 24 experimentos variando el tiempo de crecimiento de las colonias en las LentiKats y el número de etapas de crecimiento en medio fresco, ya que resulta fundamental obtener un biocatalizador óptimamente poblado para aprovechar toda la superficie de la partícula sin taponar los poros para evitar problemas difusionales. Los resultados mostraron que para obtener un biocatalizador aceptablemente activo era necesario hacer crecer las colonias en el interior de las

LentiKats en dos etapas consecutivas de crecimiento de 24 h de duración en medio complejo. Asimismo, los estudios preliminares de reutilización del biocatalizador en modo *batch* probaron que la actividad enzimática se mantenía prácticamente intacta tras 6 ciclos de producción de 24 h de duración. Adicionalmente, se realizó un experimento en modo *fed-batch* para permitir la acumulación de DHA en el caldo y comprobar el nivel de protección que ofrecen las LentiKats frente a la inhibición por producto. Inesperadamente, se observó que el efecto inhibitorio era más acusado en el experimento con las células inmovilizadas que con las células libres. No obstante, el experimento con las células inmovilizadas transcurrió más lentamente y este aumento en el tiempo de exposición a la DHA puede ser el responsable de estos resultados. Para tratar de obtener una velocidad de reacción mayor y disminuir el tiempo de exposición a la DHA se realizaron 5 experimentos aumentando la concentración de LentiKats en el biorreactor entre 70 y 170 g/L. Así, se determinó mediante un ajuste matemático que era necesario operar con una concentración de LentiKats de 288 g/L para obtener una velocidad de reacción comparable a la obtenida con células libres. A través de un análisis elemental (C, H, N y S) de las LentiKats, el gel para su fabricación y la biomasa, se pudo estimar la concentración de biomasa con la que se estaba operando en los experimentos con células inmovilizadas. Este análisis mostró que, aunque en el experimento con LentiKats la concentración de biomasa fuera 10 veces superior a la empleada en el experimento con células libres, la velocidad de reacción era inferior. El cálculo del módulo de Weisz-Prater demostró que existen problemas de difusión interna en los poros de las LentiKats, impidiendo que el sustrato pueda acceder a las células situadas en el interior de la partícula y/o favoreciendo la acumulación de DHA en los poros y con ello, la toxicidad.

La investigación desarrollada en esta Tesis Doctoral supone una profundización en la comprensión del proceso de producción de DHA a partir de glicerol con *G. oxydans* en su fase de *upstream* que permite sentar unas bases sólidas para implementar un proceso robusto, eficiente y reproducible a escala industrial, contribuyendo al desarrollo de las biorrefinerías del futuro.

8.2 CONCLUSIONES

En este apartado se recogen las principales conclusiones que se pueden extraer de la investigación realizada en esta Tesis Doctoral.

Sobre el estudio del medio producción

1. Respecto a la composición del medio de cultivo

- a. La adición de fuente compleja (peptona y extracto de levadura) favorece en gran medida el crecimiento bacteriano y la producción de ácido glicérico, pero no la producción de DHA, en las condiciones estudiadas (200 rpm).
- b. Se comprueba mediante un ensayo de actividad enzimática con células en estado de *resting cells* que:
 - i. La actividad enzimática del ensayo en *resting cells* y la velocidad inicial de producción del experimento son idénticas. Por tanto, $R_{DHA}^0 = a_0$.
 - ii. La actividad enzimática aumenta proporcionalmente con la concentración de biomasa sólo para concentraciones de biomasa menores de 0,2 g/L. A partir de esta concentración de biomasa, no se produce un aumento significativo en la actividad enzimática, lo que indica que hay un factor limitante a partir de dicha concentración.
 - iii. El test estándar de medida de actividad enzimática definido en la bibliografía puede no proporcionar valores válidos porque supone que la actividad enzimática es proporcional a la cantidad de biomasa y esto no se cumple para todas las concentraciones de biomasa.

2. Respecto a la inhibición por sustrato

- a. Para concentraciones iguales o inferiores a 133 g/L de glicerol no se produce inhibición por sustrato, tal y como refleja la velocidad inicial de producción idéntica en todo el intervalo de concentraciones estudiado.
- b. Se produce una ralentización del proceso a tiempos altos cuando se emplean altas concentraciones iniciales de glicerol debido a la acumulación de DHA en el medio (inhibición por producto).

- c. Operar con altas concentraciones iniciales de glicerol conduce a una mayor producción de ácido glicérico, principal subproducto de la biotransformación, y a la correspondiente bajada del pH en el caldo de cultivo.

3. Respecto a la inhibición por producto

- a. Existe un acusado efecto de inhibición por producto que se traduce en una disminución considerable de la velocidad inicial de producción de DHA al aumentar la concentración inicial de DHA en el medio.
- b. La disminución de la actividad enzimática con la concentración inicial de DHA se puede describir mediante la siguiente ecuación:

$$a_0 = a_0^{max} \cdot \left(1 - \frac{C_{DHA}^0}{C_{DHA}^{max}} \right), \text{ donde } a_0^{max} \text{ es la actividad enzimática máxima, que en las}$$

condiciones en las que se ha trabajado corresponde a 0,85 g/(L·h) y C_{DHA}^{max} es la concentración máxima de DHA, a partir de la cual, el proceso se inhibe totalmente, y en este caso corresponde a un valor de 159 g/L.

- c. La toxicidad producida por la DHA aumenta con el tiempo de exposición, de modo que durante las primeras 33 h la velocidad de producción es constante con el tiempo, mientras que a tiempos superiores la velocidad de producción se va ralentizando.

4. Respecto al empleo de glicerol crudo

- a. No existen diferencias significativas en la velocidad de producción de DHA cuando se emplea glicerol puro o crudo, al menos con una concentración inicial de 30 g/L de glicerol.
- b. El aumento de la concentración de glicerol crudo y, por ende, de sus impurezas, favorece la producción de biomasa y de ácido glicérico en detrimento de la producción de DHA.
- c. La caída del pH es menor con glicerol crudo debido al efecto tampón de las impurezas que lo acompañan.

Sobre el estudio de las condiciones de operación

5. Respecto a la influencia de la temperatura

- a. En el intervalo estudiado (25-37 °C), la temperatura no afecta al rendimiento final pero sí a la actividad enzimática, a la productividad volumétrica y a la productividad específica. La actividad enzimática presenta su valor más alto en el intervalo de temperaturas de 30-35°C.
- b. La temperatura óptima para llevar a cabo el proceso se establece en 30 °C, ya que a esta temperatura la actividad enzimática y la productividad volumétrica son máximas.

6. Respecto a la influencia del pH

- a. Existe una relación directa entre la producción de ácido glicérico y la acidificación del medio con el tiempo. La producción de ácido glicérico se ve favorecida a pH iniciales más básicos y es proporcional a la cantidad de biomasa presente.
- b. Si el pH cae por debajo de 4 se inhibe completamente el proceso evitando que se alcance una conversión completa.
- c. La velocidad de producción de DHA es independiente de la estrategia de pH empleada (pH controlado o pH libre), siempre que se evite la disminución del pH hacia valores por debajo de 4.

7. Respecto a la influencia de la agitación y el porcentaje de inóculo

- a. Cuando el porcentaje de inóculo es inferior al 20 % v/v ($C_X^{final} < 0,25$ g/L), la actividad enzimática es proporcional a la cantidad de biomasa final e independiente de la agitación, respondiendo a la siguiente ecuación:

$$a_0 \left(\frac{g_{DHA}}{L \cdot h} \right) = 4,94 \cdot C_X^{final} \quad \forall \quad C_X^{final} < 0,25 \text{ g/L}$$

Cuando el porcentaje de inóculo es superior al 20 % v/v ($C_X^{final} > 0,25$ g/L), la actividad enzimática no es proporcional a la concentración de biomasa, siendo menor de lo esperado.

- b. Se identifica como factor limitante una agitación inadecuada cuando la concentración de biomasa es elevada. Esto es, un escaso aporte de oxígeno por célula. Por tanto, los dos factores más importantes en este proceso son la concentración de biomasa (C_X) y el aporte de oxígeno (k_La).

Sobre el estudio de producción de DHA en resting cells

8. Respecto a los estudios en matraz Erlenmeyer

- a. El tampón acetato es el amortiguador de pH idóneo por ser capaz de evitar la caída del pH por debajo de 4 incluso operando con altas concentraciones de biomasa, que conducen a una mayor producción de ácido glicérico.
- b. La actividad enzimática en *resting cells* se puede predecir en función de los dos factores fundamentales del proceso: k_La y C_X , a través de la siguiente ecuación, válida para condiciones aerobias ($k_La > 0$):

$$a_0 \left(\frac{g_{DHA}}{L \cdot h} \right) = \frac{A \cdot \exp(R_0 \cdot k_La) \cdot C_X}{C_X + km}, \text{ donde: } A = 0,75 \text{ g/(L} \cdot \text{h)}; R_0 = 71,73 \text{ s y } km = 0,26 \text{ g/L.}$$

9. Respecto a los estudios en biorreactor tipo tanque agitado

- a. El método predictivo propuesto por García-Ochoa y Gómez (2004) para estimar el k_La en biorreactor conduce a buenos resultados.
- b. Se demuestra que para agitaciones inferiores a 560 rpm ($k_La < 0,0142s^{-1}$), cuando se trabaja con una concentración de biomasa de 0,5 g/L, el proceso está controlado por la velocidad de transporte de oxígeno gas-líquido. Bajo esta condición, se cumple que: a_0 , q_{O_2} y $OUR^{máx.}$ aumentan con k_La ; $OTR_{exp.}^{máx.} = OTR_{teórico}^{máx.}$ y $\eta_{TM}^{máx.} \approx 1$.
- c. El valor crítico de oxígeno disuelto ($C_{O_2}^{Crít}$) es el 10 % del valor de saturación de oxígeno en el caldo. Es decir, se debe cumplir que $C_{O_2} > 0,8 \text{ mg/L}$ (30 °C) para que la etapa de transferencia de oxígeno no sea la que controle la velocidad global del proceso.

- d. Se observa estrés hidrodinámico, esto es, disminución en el número de células viables con el tiempo, en especial para agitaciones superiores a 560 rpm ($k_L a > 0,0142s^{-1}$), donde se aprecia una disminución de $OUR^{máx.}$ (detector de estrés).
- e. La actividad enzimática permanece constante para agitaciones superiores a 560 rpm a pesar del daño celular, lo que confirma la robustez de la enzima glicerol deshidrogenasa y que el proceso está controlado por la velocidad de la transformación bioquímica.
- f. La producción de ácido glicérico es independiente del aporte de oxígeno y su mayor acumulación en el caldo se produce cuando se prolonga el tiempo de reacción.

Sobre el modelo cinético con células en estado de resting cells

10. Respecto a los modelos cinéticos propuestos en función de la velocidad controlante

- a. En los experimentos en *resting cells* realizados en matraz *Erlenmeyer* la etapa controlante es la velocidad de transferencia de oxígeno, ya que pueden ser bien descritos mediante un modelo basado en dicha suposición.
- b. Los experimentos en los que la velocidad del proceso está controlada por la velocidad de transferencia de oxígeno presentan una cinética de orden 0, que se puede describir a través de las siguientes ecuaciones generales, con los valores de los parámetros cinéticos de la Tabla 6.4 para matraz *Erlenmeyer* (suponiendo $C_{O_2}(t) = 0$ y $C_X = \text{constante}$) y de la Tabla 6.7 para biorreactor (donde $C_X = f(t)$ debido al estrés hidrodinámico y $k_X \approx 0$).

$$R_{DHA} = \frac{Y_{DHA,O_2}^{máx.} \cdot C_X(t)}{k_X + C_X(t)} \cdot k_L a \cdot (C_{O_2}^* - C_{O_2}(t))$$

$$R_{Glic} = -\nu_G \cdot \frac{Y_{DHA,O_2}^{máx.} \cdot C_X(t)}{k_X + C_X(t)} \cdot k_L a \cdot (C_{O_2}^* - C_{O_2}(t))$$

- c. Los experimentos en los que la velocidad del proceso está controlada por la velocidad de la biotransformación presentan una cinética de tipo Michaelis-Menten, que se puede describir mediante las siguientes ecuaciones, con los valores de los parámetros de la Tabla 6.6:

$$R_{DHA} = \frac{dC_{DHA}}{dt} = \frac{k_{cat} \cdot C_{Glic}}{k_m + C_{Glic}} \cdot C_X$$

$$R_{Glic} = -\frac{dC_{Glic}}{dt} = -\nu_G \cdot \frac{k_{cat} \cdot C_{Glic}}{k_m + C_{Glic}} \cdot C_X$$

Sobre la producción de DHA con células inmovilizadas en LentiKats

11. Respecto a la preparación y reutilización del biocatalizador

- a. La obtención de un biocatalizador activo requiere la realización de dos etapas consecutivas de 24 h de crecimiento en medio complejo fresco con el fin de incrementar el tamaño de las colonias para aprovechar la máxima superficie de la partícula posible y maximizar la actividad enzimática.
- b. La inmovilización de *G. oxydans* en LentiKats presenta un elevado potencial de reutilización ya que, tras 144 h de uso repartidas en 6 ciclos de producción de 24 h en modo discontinuo, el biocatalizador conserva el 90 % de su actividad inicial, siendo éste el valor más alto reportado en bibliografía para un tiempo de uso similar.

12. Respecto a la producción de DHA con células inmovilizadas en modo *fed-batch*

- a. La velocidad de consumo de glicerol disminuye tras cada pulso introducido como consecuencia de la acumulación de DHA (inhibición por producto) tanto con células libres como con células inmovilizadas. El proceso con células inmovilizadas transcurre notablemente más lento que con células libres.
- b. La actividad remanente tras cada pulso es menor en el proceso con células inmovilizadas, no pudiéndose demostrar las ventajas protectoras frente a tóxicos de la inmovilización frente a células libres. La concentración final de DHA alcanzada es idéntica empleando células libres y células inmovilizadas.

13. Respecto a la concentración de biocatalizador en el biorreactor

- a. El aumento de la concentración de LentiKats en el biorreactor supone un aumento proporcional de la actividad enzimática, pero no tan notorio como cabría esperar, estimándose en 288 g/L la concentración de LentiKats a emplear para obtener resultados comparables con los obtenidos con células libres.

- b.** La estimación de la concentración de biomasa en las LentiKats y el cálculo del módulo de Weisz-Prater permiten identificar la principal limitación de la aplicación de esta tecnología al proceso de producción de DHA con *G. oxydans*: la limitación a la transferencia de materia interna, en los poros del soporte.

8.3 RECOMENDACIONES

En este epígrafe se presentan brevemente una serie de recomendaciones para continuar futuras investigaciones acerca de este proceso productivo.

El estudio exhaustivo del proceso de obtención de DHA a partir de glicerol con *G. oxydans* llevado a cabo en la presente Tesis Doctoral ha permitido identificar tanto los puntos fuertes, como los puntos débiles del proceso. Destacando entre los primeros, el elevado rendimiento a DHA obtenido, la robustez de la enzima glicerol deshidrogenasa y la posibilidad de operar en *resting cells*; entre los segundos, cabe comentar la fuerte dependencia del oxígeno, la escasez de biomasa producida y la inhibición por producto. En cuanto a la dependencia del oxígeno, en este trabajo se han presentado varias herramientas para identificar el nivel de aporte de oxígeno requerido en función de la concentración de biomasa a utilizar para evitar que el proceso esté controlado por la transferencia de materia ($C_{O_2}^{crit}$, q_{O_2}). Sin embargo, un aspecto en el que no se ha incidido es en la búsqueda de un medio más económico y más eficiente para producir las células, ya que el medio complejo empleado a base de extracto de levadura y peptona es costoso y la máxima concentración de biomasa obtenida es de 1 g/L. Además, otra posible área de mejora es la búsqueda de soluciones para paliar el fenómeno de inhibición por producto.

De este modo, las futuras investigaciones deberían encaminarse por un lado, al abaratamiento y optimización del medio de cultivo para la obtención del inóculo, usando por ejemplo, algún residuo industrial rico en nutrientes y, por otro lado, a disminuir el efecto de la inhibición por producto seleccionando un soporte para la inmovilización que presente un tamaño de poro adecuado para evitar problemas de difusión interna como los reportados en el Capítulo 7 y/o empleando herramientas de Ingeniería Genética para la obtención de mutantes resistentes a la DHA.

NOMENCLATURA

a	Área interfacial específica (m^{-1})
A	Parámetro de ajuste ($\text{g/L}\cdot\text{h}$) de las ecuaciones [5.4] y [5.5]
a₀	Actividad enzimática ($\text{g}_{\text{DHA}}/\text{L}\cdot\text{h}$)
A_{600nm}	Absorbancia a 600 nm
ADH	Enzima alcohol deshidrogenasa
ALDH	Enzima aldehído deshidrogenasa
ATP	Adenosín trifosfato
C*_{O₂}	Concentración de saturación de oxígeno (%; mol/L)
C⁰_{DHA}	Concentración de DHA presente en el caldo inicialmente
C⁰_{GA}	Concentración de GA presente en el caldo inicialmente
C^{Crít}_{O₂}	Concentración de oxígeno crítica (%)
C_{DHA}	Concentración de DHA (g/L)
C_{GA}	Concentración de GA (g/L)
C_{Glic}	Concentración de glicerol (g/L)
C_j	Concentración del compuesto j (g/L)
C_{O₂}	Concentración del oxígeno disuelto (%; mol/L)
CR	Crecimiento
C_X	Concentración de biomasa (g/L)
d	Dilución de la muestra

DAD	Detector diodo de array (HPLC)
d_b	Diámetro de burbuja (m)
D_e	Coeficiente de difusión efectivo (m^2/s)
DHA	Dihidroxiacteona
DHA-P	Dihidroxiacetona fosfato
D_L	Difusividad en el líquido (m^2/s)
d_p	Diámetro de partícula del catalizador
E_r	Error relativo definido por la ecuación [6.15]
ERMC	Error residual medio al cuadrado
FB	<i>Fed-batch</i>
F_{O_2}	Flujo molar de oxígeno (mol/s)
F_{Obj}	Función objetivo
g	Constante gravitacional (m/s^2)
GA	Ácido glicérico
GDH	Enzima glicerol deshidrogenasa
Glic	Glicerol
GTBE	Ésteres terciarios ramificados
h	Altura del líquido (cm)
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución

K	Índice de consistencia en el modelo de la ley de la potencia
k	Constante cinética (g/L·h)
k_{cat}	Parámetro de ajuste (g _{DHA} /g _X ·h)
k'_{DHA, O2}	Parámetro de ajuste (mol _{DHA} /mol _{O2})
K_j^{Detector}	Constante de calibrado para el detector correspondiente del HPLC y el compuesto j
k_L	Coeficiente de transferencia de materia (m/s)
k_La	Coeficiente de transporte de oxígeno (s ⁻¹)
km	Constante de afinidad por el sustrato en el modelo de Michaelis-Menten adaptado (g _{Glic} /L)
k_s	Constante de afinidad por el sustrato en el modelo de Hinshelwood adaptado (g/L)
k_x	Parámetro de ajuste (g _X /L)
Lent	LentiKats
MPEG-pDHA	Polímero de polietilenglicol y policarbonato de dihidroxiacetona
MTBE	Metil tert-butil éter
MWCNT	Nanotubos de carbono de pared múltiple
n	Índice de flujo de la ley de la potencia
N	Velocidad del agitador (rpm)
NAD⁺	Dinucleótido de nicotinamida y adenina.
NADH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido
Nd	Número total de datos

NO_x	Óxidos de nitrógeno
N_P	Número de potencia
N_{W-P}	Módulo de Weisz-Prater
OTR	Velocidad de transporte de oxígeno (mol O ₂ /L·s)
OUR	Velocidad de consumo de oxígeno (mol O ₂ /L·s)
P	Presión (atm)
P₀	Potencia introducida por el agitador en sistemas no aireados
Pa	Número de parámetros
Pep	Peptona
PHA	Polihidroxialcanoatos
PhCHO	Benzaldehído
PID	Controlado proporcional, integral y derivativo
P_s	Productividad específica (g _{DHA} /g _X ·h)
P_t	Potencia suministrada (W)
P_v	Productividad volumétrica (g _{DHA} /L·h)
PVA	Polivinilalcohol
Q	Caudal de aire (L/min)
q_{O2}	Velocidad específica de consumo de oxígeno (mol _{O2} /g _X ·s)
R₀	Parámetro de ajuste (s) de las ecuaciones [5.4] y [5.5]

r^2	Coeficiente de correlación estadística
R_{DHA}	Velocidad de producción de la DHA (g/L·h)
Re	Número de Reynolds
R_{GA}	Velocidad de producción del ácido glicérico (g/L·h)
R_{Glic}	Velocidad de producción del glicerol (g/L·h)
r_i	Velocidad de la reacción i (g/L·h)
RID	Detector índice de refracción (HPLC)
R_j	Velocidad de producción del compuesto j (g/L·h)
r_{obs}	Velocidad de reacción observada (g/L·h)
$s.a$	Sin ajuste inicial de pH
S_{GA}	Selectividad hacia la producción de ácido glicérico (g_{GA}/g_{DHA})
SRC	Suma de residuos al cuadrado
$STBR$	Biorreactor de tipo tanque agitado
T	Diámetro del agitador (cm)
T	Temperatura (°C)
t_{CR}	Tiempo de crecimiento
t_e	Tiempo de exposición (s)
$TEMPO$	Tetrametilpiridil-N-oxil
t_R	Tiempo de retención en la columna del HPLC

UFC	Unidades formadoras de colonia
UV	Ultravioleta
VE	Porcentaje de variación explicada (%)
V_F	Volumen del matraz <i>Erlenmeyer</i>
V_L	Volumen de líquido (m ³)
V_S	Velocidad superficial del gas (m/s)
X	Biomasa
X^{max}_{Glic}	Conversión máxima de glicerol a DHA (%)
x_{O2}	Porcentaje de oxígeno en la corriente gaseosa (%)
Y_{DHA,O2}	Cociente entre los coeficientes estequiométricos v_{DHA} y v_{O2} (mol _{DHA} /mol _{O2})
YE	Extracto de levadura
Y_{P/S}	Rendimiento del producto con respecto a la cantidad inicial de sustrato (%)
1,2-PD	1,2-propanodiol
1,3-PD	1,3-propanodiol

LETRAS GRIEGAS

μ	Viscosidad (Pa·s)
μ_G	Viscosidad del gas (Pa·s)
μ_L	Viscosidad del líquido (Pa·s)
μ_w	Viscosidad del agua (Pa·s)

η_{TM}	Factor de efectividad de transferencia de materia
α y β	Constantes que dependen del tipo de agitador
ϵ	Velocidad de disipación local de energía (W/Kg)
λ	Longitud de onda (nm)
ν_{DHA}	Coefficiente estequiométrico de la DHA ($\text{mol}_{DHA}/\text{mol}_{Glic}$)
ν_G	Coefficiente estequiométrico del glicerol ($\text{mol}_{Glic}/\text{mol}_{DHA}$)
ν_{ij}	Coefficiente estequiométrico del compuesto j en cada reacción i
ν_{O_2}	Coefficiente estequiométrico del O_2 ($\text{mol}_{O_2}/\text{mol}_{Glic}$)
ρ	Densidad (Kg/m^3)
ρ_G	Densidad del gas (Kg/m^3)
ρ_L	Densidad del líquido (Kg/m^3)
σ	Tensión interfacial (N/m)
Φ	Fracción volumétrica del gas en el líquido

SUBÍNDICES

med	medio
i	Reacción $i = 1, 2, 3 \dots$
j	Compuesto j
DHA	Dihidroxiacetona

Glic	Glicerol
GA	Ácido glicérico
X	Biomasa
Lent	LentiKats
s	Específico
obs	Observado

SUPERÍNDICES

0	Referente al inicio
cal	Calculado
Crít	Crítico
exp	Experimental
final	Referente al final de la reacción
max	Máximo
n	Número de pulso de glicerol introducido al biorreactor (1, 2, 3...)
s	Específico
t	Referente a un tiempo "t"

LISTADO DE FIGURAS

CAPÍTULO 1.

Figura 1.1. Distribución del consumo final de energía para los países de la UE-28 (Eurostat, 2014).	14
Figura 1.2. Producción y consumo de biodiésel en la Unión Europea durante los años 2003-2015 (Eurostat, 2017).	15
Figura 1.3. Reacción de transesterificación para la producción de biodiésel.	16
Figura 1.4. Esquema del ciclo de vida del biodiésel.	17
Figura 1.5. Evolución de los precios del glicerol purificado al 99,5 % en el mercado europeo y estadounidense entre los años 2000 y 2010 (Ciriminna y col., 2014).	21
Figura 1.6. Principales rutas de revalorización del glicerol por vía química y biotecnológica (Zhou y col., 2008; Bozell y Petersen, 2010). Los compuestos con asterisco se pueden obtener también por biocatálisis.	23
Figura 1.7. Mecanismo de acción de la DHA sobre el estrato córneo de la piel para producir el bronceado artificial.	31
Figura 1.8. Isomería funcional de la DHA en función de la acidez del medio (Katryniok y col., 2011).	32
Figura 1.9. Ejemplos de productos derivados de la DHA (figura adaptada de Hekmat y col. (2003)).	33
Figura 1.10. Red de productos obtenidos por oxidación parcial de glicerol. Figura adaptada de Hu y col. (2016).	34
Figura 1.11. Conversión de glicerol a DHA en tres etapas. Figura adaptada de Zheng y col. (2012).	36
Figura 1.12. Reacción de oxidación parcial del etanol a ácido acético en bacterias acéticas. ..	38
Figura 1.13. Reacción de oxidación parcial de glicerol a dihidroxiacetona en bacterias acéticas.	38
Figura 1.14. Etapas generales para el desarrollo de un bioproceso tanto en la fase de upstream como en la de downstream.	41

CAPÍTULO 2.

Figura 2.1. Esquema simplificado del metabolismo de G.oxydans. Figura adaptada de Claret y col. (1994).	63
Figura 2.2. Esquema de la instalación experimental formada por una unidad de control (en el centro) y dos cubas de 1 L de capacidad (a los lados).	68
Figura 2.3. Esquema de una cuba de reacción típica: (a) vista lateral y (b) sección.	71

Figura 2.4. Esquema en planta de una cuba de reacción típica y descripción de cada uno de los orificios disponibles en la tapa.	72
Figura 2.5. Esquema del cromatógrafo de líquidos de alta resolución empleado para la cuantificación de los distintos compuestos involucrados en la biotransformación: glicerol, DHA y ácido glicérico.	74
Figura 2.6. Impresora de LentiKats.	77
Figura 2.7. Esquema ilustrativo del procedimiento experimental definido para llevar a cabo los experimentos de producción de DHA tanto con células en crecimiento, como con células en resting cells.	81
Figura 2.8. Esquema ilustrativo del procedimiento experimental realizado para la fabricación de LentiKats.	84
Figura 2.9. Rectas de calibrado C_X -absorbancia por triplicado.	86
Figura 2.10. Estructura química de los metabolitos involucrados en el proceso de producción de DHA a partir de glicerol con <i>G. oxydans</i>	87
Figura 2.11. Barrido de absorbancia a distintas longitudes de onda en la región UV para los distintos compuestos involucrados en la biotransformación: glicerol, DHA, gliceraldehído y ácido glicérico.	88
Figura 2.12. Cromatograma tipo de una mezcla de glicerol, DHA, ácido glicérico y gliceraldehído obtenido tras el análisis con el detector de diodo de array a una longitud de onda de 210 nm.	89
Figura 2.13. Rectas de calibrado para relacionar el área de pico y la concentración de cada compuesto: (a) glicerol, (b) DHA, (c) gliceraldehído y (d) ácido glicérico.	90

CAPÍTULO 3.

Figura 3.1. Evolución de la concentración de glicerol (a); la DHA (b); el ácido glicérico (c); el pH (d) y la biomasa (e) para los experimentos 5YE3Pep, 5YE, 2,5YE, 1,5YE, 0,5YE, 0,25YE y 0YE.	120
Figura 3.2. Rendimiento a DHA (diagrama de barras), productividad volumétrica (cuadrados azules) y productividad específica (triángulos rojos) en función de la cantidad de fuente de nitrógeno añadida al medio.	122
Figura 3.3. Representación de los ajustes lineales realizados a los datos obtenidos en el ensayo de actividad enzimática para distintas concentraciones de biomasa.	125
Figura 3.4. Representación de los ajustes lineales de los datos de concentración de DHA frente al tiempo de los distintos experimentos mostrados en el apartado 3.2.1 para el cálculo de R^0_{DHA}	126

Figura 3.5. Efecto de la concentración de biomasa (C_X) sobre la actividad enzimática de <i>G. oxydans</i> (a_0) a 30 °C y 200 rpm en matraz Erlenmeyer.	127
Figura 3.6. Comparación entre la velocidad de producción de DHA en los experimentos del estudio del medio (R_{DHA}^0) y la actividad enzimática obtenida en los ensayos (a_0).	128
Figura 3.7. Evolución con el tiempo del glicerol (a); la DHA (b); el ácido glicérico (c); el pH (d) y la biomasa (e) para los experimentos Glic-25, Glic-40, Glic-50, Glic-55, Glic-74, Glic-92 y Glic-134.	135
Figura 3.8. Evolución con el tiempo de la DHA (a); el glicerol (b) y el pH (c) para los experimentos Glic-25, Glic-40, Glic-50, Glic-55, Glic-74, Glic-92 y Glic-134. Las líneas discontinuas separan las tres regiones en las que se ha dividido la producción de DHA (región I, II y III).	136
Figura 3.9. Ajustes lineales de los datos de producción de DHA de la región I frente al tiempo para los experimentos Glic-40, Glic-50, Glic-55, Glic-74, Glic-92 y Glic-134.	137
Figura 3.10. Efecto de la concentración inicial de glicerol sobre la velocidad inicial de producción de DHA en la región I (R_{DHA}^0).	138
Figura 3.11. Representación gráfica de la relación entre el pH final del caldo y la conversión máxima de glicerol alcanzada (X_{Glic}^{max}) en los experimentos Glic-25, Glic-40, Glic-50, Glic-55, Glic-74, Glic-92 y Glic-134.	140
Figura 3.12. Representación gráfica de la relación entre el pH final del caldo y el rendimiento obtenido ($Y_{P/S}$) en los experimentos Glic-25, Glic-40, Glic-50, Glic-55, Glic-74, Glic-92 y Glic-134.	140
Figura 3.13. Evolución con el tiempo del glicerol (a); la DHA (b); el ácido glicérico (c); el pH (d) y la biomasa (e) para los experimentos Glic-92 (sin tamponar) y Glic-80/tamp (tamponado).	144
Figura 3.14. Evolución con el tiempo del glicerol (a); la DHA (b); el ácido glicérico (c); el pH (d) y la biomasa (e) para los experimentos DHA ₀ -0, DHA ₀ -30, DHA ₀ -60, DHA ₀ -90. La línea discontinua muestra la separación entre las regiones I y II.	149
Figura 3.15. Representación gráfica de la DHA presente en el caldo en función del tiempo para los experimentos Glic-80/tamp y DHA ₀ -30, la línea roja muestra el tiempo en el que se produce la transición entre la zona lineal de producción (región I) y la zona de producción no lineal (región II).	150
Figura 3.16. Representación de los ajustes lineales de los datos de concentración de DHA frente al tiempo de los experimentos del estudio de inhibición por producto para el cálculo de R_{DHA}^0	151
Figura 3.17. Efecto de la concentración inicial de producto sobre la actividad enzimática (a_0).	153

Figura 3.18. Evolución con el tiempo del glicerol (a); la DHA (b); el ácido glicérico (c); el pH (d) y la biomasa (e) para los experimentos Glic-30/puro s.a y Glic-30/crudo s.a.....	161
Figura 3.19. Evolución con el tiempo del glicerol (a); la DHA (b); el ácido glicérico (c); el pH (d) y la biomasa (e) para los experimentos Glic-30/crudo s.a y Glic-30/crudo 6,5.	163
Figura 3.20. Evolución con el tiempo del glicerol (a); la DHA (b); el ácido glicérico (c); el pH (d) y la biomasa (e) para los experimentos Glic-30/crudo 6,5, Glic-45/crudo 6,5 y Glic-65/crudo 6,5.	165
Figura 3.21. Representación de los ajustes lineales de los datos de concentración de DHA frente al tiempo de los experimentos Glic-30/crudo 6,5, Glic-45/crudo 6,5 y Glic-65/crudo 6,5 para el cálculo de R^0_{DHA}	166
Figura 3.22. Efecto de la concentración inicial de glicerol crudo sobre la velocidad de producción de DHA inicial (R^0_{DHA}).	167
Figura 3.23. Representación gráfica de la relación entre el pH final del caldo y el porcentaje de glicerol consumido para los experimentos Glic-30/crudo 6,5, Glic-45/crudo 6,5 y Glic-65/crudo 6,5.	168

CAPÍTULO 4.

Figura 4.1. Evolución con el tiempo del glicerol (a); la DHA (b); el ácido glicérico (c); el pH (d) y la biomasa (e) para los experimentos T25, T28, T30, T32, T35 y T37.	187
Figura 4.2. Rendimiento a DHA; $Y_{P/S}$ (círculos negros), productividad volumétrica; P_V (cuadrados azules) y productividad específica; P_S (triángulos rojos) en función de la temperatura.	188
Figura 4.3. Representación de los ajustes lineales de los datos de concentración de DHA frente al tiempo de los experimentos realizados a diferentes temperaturas para el cálculo de la actividad enzimática.	189
Figura 4.4. Efecto de la temperatura sobre la actividad enzimática de <i>G. oxydans</i> (a_0) en matraz Erlenmeyer a 200 rpm, con un 20 % v/v de inóculo y un pH_0 de 5,9.	190
Figura 4.5. Evolución con el tiempo del glicerol (a); la DHA (b); el ácido glicérico (c); el pH (d) y la biomasa (e) para los experimentos 0YE-pHcont y 0YE-pHlibre.	196
Figura 4.6. Evolución con el tiempo del glicerol (a); la DHA (b); el ácido glicérico (c); el pH (d) y la biomasa (e) para los experimentos 0YE-pHcont y 5YE-pHcont.	198
Figura 4.7. Evolución con el tiempo del glicerol (a); la DHA (b); el pH (c) y la biomasa (d) para los experimentos con un 5 % v/v de inóculo a 200 rpm, 300 rpm y 400 rpm (In5%-200, In5%-300, In5%-400).	208

Figura 4.8. Evolución con el tiempo del glicerol (a); la DHA (b); el pH (c) y la biomasa (d) para los experimentos con un 10 % v/v de inóculo a 200 rpm, 300 rpm y 400 rpm (In10%-200, In10%-300, In10%-400).....	208
Figura 4.9. Evolución con el tiempo del glicerol (a); la DHA (b); el pH (c) y la biomasa (d) para los experimentos con un 20 % v/v de inóculo a 200 rpm, 300 rpm y 400 rpm (In20%-200, In20%-300, In20%-400).....	209
Figura 4.10. Evolución con el tiempo del glicerol (a); la DHA (b); el pH (c) y la biomasa (d) para los experimentos con un 40 % v/v de inóculo a 200 rpm, 300 rpm y 400 rpm (In40%-200, In40%-300, In40%-400).....	209
Figura 4.11. Representación de los ajustes lineales de los datos de concentración de DHA frente al tiempo para el cálculo de la actividad enzimática de los experimentos llevados a cabo con un porcentaje de inóculo del 5 % v/v (a); 10 % v/v (b); 20 % v/v (c) y 40 % v/v (d) a diferentes agitaciones (200, 300 y 400 rpm).	210
Figura 4.12. Efecto de la concentración final de biomasa (C_X^{final}) sobre la actividad enzimática de G. oxydans (a_0) a varias agitaciones en matraz Erlenmeyer. La línea discontinua representa el ajuste lineal de los datos experimentales en el tramo en el que a_0 es proporcional a C_X^{final}	212

CAPÍTULO 5.

Figura 5.1. Evolución con el tiempo del glicerol (a); la DHA (b); el ácido glicérico (c) y el pH (d) para los experimentos realizados a 200 rpm con tampón fosfato y diferentes concentraciones de resting cells.....	233
Figura 5.2. Evolución con el tiempo del glicerol (a); la DHA (b); el ácido glicérico (c) y el pH (d) para los experimentos realizados a 200 rpm con tampón acetato y diferentes concentraciones de resting cells.....	234
Figura 5.3. Representación de los ajustes lineales de los datos de concentración de DHA frente al tiempo para los experimentos realizados a 200 rpm con diferentes concentraciones de resting cells y tampón fosfato para el cálculo de la actividad enzimática.	235
Figura 5.4. Representación de los ajustes lineales de los datos de concentración de DHA frente al tiempo para los experimentos realizados a 200 rpm con diferentes concentraciones de resting cells y tampón acetato para el cálculo de la actividad enzimática.	235
Figura 5.5. Comparación de la actividad enzimática en función de la concentración de biomasa para los experimentos realizados con tampón fosfato y acetato.....	236

Figura 5.6. Evolución con el tiempo del glicerol (a); la DHA (b); el ácido glicérico (c) y el pH (d) para los experimentos realizados con distintas concentraciones de resting cells a 100 rpm .	247
Figura 5.7. Evolución con el tiempo del glicerol (a); la DHA (b); el ácido glicérico (c) y el pH (d) para los experimentos realizados con distintas concentraciones de resting cells a 200 rpm .	247
Figura 5.8. Evolución con el tiempo del glicerol (a); la DHA (b); el ácido glicérico (c) y el pH (d) para los experimentos realizados con distintas concentraciones de resting cells a 300 rpm .	248
Figura 5.9. Evolución con el tiempo del glicerol (a); la DHA (b); el ácido glicérico (c) y el pH (d) para los experimentos realizados con distintas concentraciones de resting cells a 400 rpm .	248
Figura 5.10. Representación de los ajustes lineales de los datos de concentración de DHA frente al tiempo para el cálculo de la actividad enzimática de los experimentos llevados a cabo con distintas concentraciones de resting cells a diferentes agitaciones: 100 rpm (a); 200 rpm (b); 300rpm (c) y 400 rpm (d).	249
Figura 5.11. Efecto de la concentración de biomasa sobre la actividad enzimática de G. oxydans (a_0) para cada una de las agitaciones ensayadas.	251
Figura 5.12. Relación entre el parámetro a_0^{\max} y k_La . Los puntos negros representan los valores experimentales y la línea roja el ajuste de los datos a la ecuación [5.4].	252
Figura 5.13. Ajuste simultáneo de la ecuación [5.5] a todos los experimentos en función de la concentración de biomasa y k_La (línea negra).	254
Figura 5.14. Representación de los valores de actividad enzimática predichos por el modelo frente a los valores experimentales. La bisectriz indica las predicciones sin error y las líneas rojas muestran una desviación de $\pm 10\%$ respecto a los valores experimentales.	254
Figura 5.15. Influencia de la velocidad de agitación sobre k_La calculado a partir de los datos experimentales y según el método predictivo descrito en el Apartado 2.5.1.	266
Figura 5.16. Evolución con el tiempo del glicerol (a); la DHA (b); el ácido glicérico (c), el pH (d) y el oxígeno disuelto (e) para los experimentos realizados a distintas agitaciones en biorreactor.	268
Figura 5.17. OTR vs OUR para tiempos menores de 8 min (gráfica (a)) y para tiempos mayores de 8 min (gráfica (b)). La línea negra continua muestra la bisectriz, en la cual se cumple que $OTR=OUR$.	269
Figura 5.18. Influencia de k_La sobre el valor máximo de OTR teórico y experimental.	270
Figura 5.19. Evolución del factor de efectividad de transferencia de materia (η_{TM}) con el tiempo para los experimentos a distintas agitaciones.	271

Figura 5.20. Factor de efectividad de transferencia de materia máximo ($\eta_{TM}^{máx.}$) para cada una de las agitaciones.	271
Figura 5.21. Influencia de k_{La} sobre el valor máximo de OUR.	272
Figura 5.22. Representación de los ajustes lineales de los datos de concentración de DHA frente al tiempo para los experimentos realizados a distintas agitaciones en biorreactor con una concentración de células en estado de resting cells de 0,5 g/L para el cálculo de la actividad enzimática.	274
Figura 5.23. Efecto de k_{La} sobre q_{O_2} (gráfica (a)) y a_0 (gráfica (b)). La línea negra continua en posición vertical divide las gráficas en dos zonas: zona (I) en la que se aprecia una limitación por oxígeno y la zona (II) en la que los resultados no se ven afectados por el aporte de oxígeno.	275
Figura 5.24. Representación de la influencia de la concentración mínima de oxígeno disuelto sobre q_{O_2}	276
Figura 5.25. Comparación de la evolución de los valores máximos experimentales de OUR y q_{O_2} con k_{La} . La línea vertical discontinua indica la separación entre la zona (I) y la zona (II).	277
Figura 5.26. Evolución del número de células viables (%) con el tiempo.	278
Figura 5.27. Representación de los ajustes lineales de los datos de concentración de ácido glicérico frente al tiempo para los experimentos realizados a distintas agitaciones en biorreactor con una concentración de células en estado de resting cells de 0,5 g/L para el cálculo de R_{GA}^0	279
Figura 5.28. Influencia de k_{La} sobre la velocidad inicial de producción de ácido glicérico (R_{GA}^0), sobre su concentración final (C_{GA}^{final}) y la selectividad (S_{GA}).	281

CAPÍTULO 6.

Figura 6.1. Evolución de la concentración de DHA con el tiempo para los experimentos con células en estado de resting cells realizados en incubadora orbital. Las líneas representan el ajuste de los datos a la ecuación [6.3].	292
Figura 6.2. Evolución de la concentración de glicerol con el tiempo para los experimentos con células en estado de resting cells realizados en incubadora orbital. Las líneas representan el ajuste de los datos a la ecuación [6.4].	293
Figura 6.3. Relación entre la velocidad de producción de DHA y el coeficiente volumétrico de transporte de oxígeno (k_{La}).	295

Figura 6.4. Influencia de la concentración de biomasa sobre el rendimiento Y_{DHA,O_2}	296
Figura 6.5. Comparación entre los valores experimentales y predichos por el modelo cinético propuesto para los experimentos con distinta concentración de células en estado de resting cells realizados en matraz Erlenmeyer y agitados en incubadora orbital a 100 rpm	298
Figura 6.6. Comparación entre los valores experimentales y predichos por el modelo cinético propuesto para los experimentos con distinta concentración de células en estado de resting cells realizados en matraz Erlenmeyer y agitados en incubadora orbital a 200 rpm	299
Figura 6.7. Comparación entre los valores experimentales y predichos por el modelo cinético propuesto para los experimentos con distinta concentración de células en estado de resting cells realizados en matraz Erlenmeyer y agitados en incubadora orbital a 300 rpm	300
Figura 6.8. Comparación entre los valores experimentales y predichos por el modelo cinético propuesto para los experimentos con distinta concentración de células en estado de resting cells realizados en matraz Erlenmeyer y agitados en incubadora orbital a 400 rpm	301
Figura 6.9. Análisis del error relativo obtenido en la predicción realizada con el modelo propuesto (ecuaciones [6.12] y [6.13]) para los experimentos realizados en matraz Erlenmeyer.	302
Figura 6.10. Velocidad de producción frente al valor de k_La para los experimentos en biorreactor y en matraz sin considerar la resistencia adicional del tapón de algodón y considerando la misma.	304
Figura 6.11. Evolución de la concentración de glicerol (a), DHA (b) y oxígeno disuelto (c) con el tiempo para los experimentos en resting cells realizados en biorreactor a distintas agitaciones.	306
Figura 6.12. Análisis del error relativo obtenido en la predicción realizada con el modelo propuesto (ecuaciones [6.15] y [6.16]) para los experimentos realizados en biorreactor a $N > 560$ rpm.	308
Figura 6.13. Comparación entre los valores experimentales y predichos por el modelo cinético propuesto para los experimentos con una concentración de biomasa de 0,5 g/L en estado de resting cells realizados en biorreactor tanque agitado a agitaciones superiores a 560 rpm. ..	309
Figura 6.14. Simulación de los experimentos en biorreactor B-300, B-420 y B-560 con el modelo planteado para el caso en el que controla la reacción bioquímica, definido por las ecuaciones [6.16] y [6.17].	310
Figura 6.15. Análisis del error relativo obtenido en la predicción realizada con el modelo propuesto (ecuaciones [6.19] y [6.20]) para los experimentos realizados en biorreactor a $N < 560$ rpm.	312

Figura 6.16. Comparación entre los valores experimentales y predichos por el modelo cinético propuesto para los experimentos con una concentración de biomasa de 0,5 g/L en estado de resting cells realizados en biorreactor tanque agitado a agitaciones inferiores a 560 rpm..... 313

CAPÍTULO 7.

Figura 7.1. (a) Esquema del proceso a nivel de planta piloto desarrollado para la producción de LentiKats en continuo. (b) Vista esquemática de una partícula LentiKat. Imágenes obtenidas de la web: <http://www.lentikats.eu>. 321

Figura 7.2. Representación de los ajustes lineales de los datos de concentración de DHA frente al tiempo para el cálculo de la actividad enzimática tras distintos tiempos de crecimiento de las colonias en las LentiKats. 325

Figura 7.3. Efecto del tiempo de crecimiento de las colonias en las LentiKats en medio complejo sobre la actividad enzimática del biocatalizador. 326

Figura 7.4. Ajustes lineales de los datos de concentración de DHA frente al tiempo para el cálculo de la actividad enzimática tras varias etapas de crecimiento de 24 h de las colonias en las LentiKats..... 330

Figura 7.5. Efecto del número de etapas de crecimiento en medio fresco de las colonias en las LentiKats sobre la actividad del biocatalizador. 332

Figura 7.6. Imágenes de LentiKats obtenidas tras las distintas etapas de crecimiento de 24 h sobre medio fresco. 332

Figura 7.7. Relación entre actividad enzimática y concentración de LentiKats en el caldo para una agitación de 300 rpm..... 334

Figura 7.8. Relación entre la actividad enzimática específica y la concentración de LentiKats en el caldo para una agitación de 300 rpm. 334

Figura 7.9. Representación de los ajustes lineales de los datos de concentración de DHA frente al tiempo para el cálculo de la actividad enzimática de cada uno de los ciclos de producción realizados con las mismas LentiKats. 337

Figura 7.10. Evolución de la actividad enzimática tras los distintos ciclos productivos de 24 h realizados con las mismas LentiKats. 338

Figura 7.11. Comparación de los datos experimentales con los datos bibliográficos de la actividad remanente tras la reutilización del biocatalizador en función del tiempo total de uso. 339

Figura 7.12. Evolución con el tiempo del glicerol (a); la DHA (b); el ácido glicérico (c) y el oxígeno disuelto (d) para los experimentos realizados en modo fed-batch con células libres e inmovilizadas..... 344

Figura 7.13. Representación de los ajustes lineales de los datos de concentración de glicerol frente al tiempo para el cálculo de la velocidad de consumo en los experimentos en modo fed-batch con células libres e inmovilizadas.	345
Figura 7.14. Evolución de la velocidad de consumo de glicerol en función de la concentración de DHA previa tras cada pulso para los experimentos con células libres e inmovilizadas.	346
Figura 7.15. Representación gráfica de la actividad remanente tras cada pulso para los experimentos con células libres y con células inmovilizadas.	347
Figura 7.16. Representación de los ajustes lineales de los datos de concentración de DHA frente al tiempo para el cálculo de la actividad enzimática de los experimentos en modo fed-batch con células libres e inmovilizadas.	348
Figura 7.17. Evolución de la concentración de oxígeno disuelto a lo largo del experimento con sucesivas adiciones de LentiKats.	352
Figura 7.18. Representación de los ajustes lineales de los datos de concentración de DHA frente al tiempo para el cálculo de la actividad enzimática obtenida con cada adición al biorreactor de diferentes cantidades de LentiKats.	353
Figura 7.19. Influencia de la concentración de LentiKats en el biorreactor sobre la actividad enzimática.	354
Figura 7.20. Representación de los ajustes lineales de los datos de concentración de glicerol frente al tiempo para el cálculo de la velocidad de desaparición del glicerol para cada una de las concentraciones de LentiKats estudiada.	358